



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 955 171**

⑮ Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2019 E 19218272 (3)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2023 EP 3671200**

⑭ Título: **Aplicaciones CE-Western para el desarrollo de anticuerpos**

⑯ Prioridad:
19.12.2018 US 201862781790 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2023

⑮ Titular/es:
REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

⑯ Inventor/es:
PALACKAL, NISHA;
LU, KUN;
DHULIPALA, GANGADHAR y
PYLES, ERICA

⑯ Agente/Representante:
IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 955 171 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

Aplicaciones CE-Western para el desarrollo de anticuerpos

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención concierne a productos biofarmacéuticos y se refiere al uso de la electroforesis capilar para detectar productos biofarmacéuticos y contaminantes en mezclas complejas.

10 ANTECEDENTES

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son una clase importante de productos bioterapéuticos, y han logrado un éxito extraordinario en el tratamiento de muchas enfermedades crónicas y potencialmente mortales. Sin embargo, los mAbs también son macromoléculas biológicas muy complejas con variantes de tamaño y carga, varias modificaciones postraduccionales, incluyendo diferentes patrones de glicosilación, y heterogeneidad de los extremos N y C terminales. Por lo tanto, cada anticuerpo monoclonal individual puede presentar un perfil único, una característica que debe tenerse en cuenta durante la evaluación de estos productos, tanto durante el desarrollo como durante la fabricación del producto final.

20 La monitorización y la evaluación de los atributos críticos de calidad (CQA) en los mAb son un requisito normativo en la industria farmacéutica. Durante la producción de mAb, también debe tenerse en cuenta la presencia de proteínas potencialmente contaminantes. Además, a medida que crece el uso de terapias de combinación (por ejemplo, el uso de múltiples mAbs en cócteles de productos farmacéuticos), la capacidad de supervisar los mAb individuales en estos cócteles también será cada vez más importante.

25 Se ha usado la electroforesis para separar mezclas de moléculas basándose en sus diferentes velocidades de desplazamiento en campos eléctricos. Generalmente, la electroforesis se refiere al movimiento de moléculas suspendidas o disueltas a través de un fluido o gel bajo la acción de una fuerza electromotriz aplicada a uno o más electrodos o miembros eléctricamente conductores en contacto con el fluido o el gel. Algunos modos conocidos de separación electroforética incluyen la separación de moléculas basada, por lo menos en parte, en diferencias en sus movilidades en una solución tampón (denominada comúnmente electroforesis zonal), en una solución de gel o polímero (denominada comúnmente electroforesis en gel), o en un gradiente de potencial de hidrógeno (pH) (denominado comúnmente enfoque isoeléctrico). Aunque las técnicas de electroforesis capilar son eficaces y se usan ampliamente en la industria para estudiar la pureza de las biomoléculas y la heterogeneidad de las cargas, no permiten la detección selectiva de varias especies ni la diferenciación de las impurezas del producto y del proceso. Por consiguiente, se necesitan métodos adicionales de control de las preparaciones y formulaciones de mAb.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

40 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar y/o discriminar entre variantes de un anticuerpo en una muestra por un parámetro físico, en el que el método incluye: separar componentes proteicos de una muestra que comprende un anticuerpo de interés por peso molecular o carga en uno o más capilares usando electroforesis capilar; inmovilizar los componentes proteicos de la muestra dentro de uno o más capilares; poner en contacto los componentes proteicos dentro de uno o más capilares con dos o más anticuerpos primarios que se unen específicamente a la proteína, como un anticuerpo, de interés, o parte de la misma; y detectar la unión de los dos o más anticuerpos primarios, detectando y/o discriminando de este modo entre variantes de tamaño del anticuerpo de interés en la muestra.

50 En varias realizaciones del método, los dos o más anticuerpos primarios comprenden por lo menos un anticuerpo que se une específicamente a una cadena pesada del anticuerpo de interés.

En varias realizaciones del método, los dos o más anticuerpos primarios comprenden por lo menos un anticuerpo que se une específicamente a una cadena ligera del anticuerpo de interés.

55 En varias realizaciones del método, los dos o más anticuerpos primarios están marcados con un marcador detectable, y la detección de la unión de los dos o más anticuerpos primarios incluye la detección del marcador detectable.

60 En varias realizaciones del método, la detección de la unión de los dos o más anticuerpos primarios incluye: poner en contacto los dos o más anticuerpos primarios con un anticuerpo secundario que se une específicamente por lo menos a uno de los dos o más anticuerpos primarios, en donde el anticuerpo secundario tiene un marcador detectable; y detectar el marcador detectable.

65 En varias realizaciones del método, los componentes proteicos de una muestra se separan por carga y el método es un método de detección y/o discriminación entre variantes de carga del anticuerpo de interés.

En varias realizaciones del método, los componentes proteicos de una muestra se separan por peso molecular y el método es un método de detección y/o discriminación entre variantes de tamaño del anticuerpo de interés.

- 5 En varias realizaciones del método, la muestra comprende uno o más anticuerpos adicionales de interés.
- En varias realizaciones del método, se detectan uno o más anticuerpos adicionales de interés.
- 10 En algunas realizaciones, el método incluye además determinar una cantidad relativa o absoluta de las variantes del anticuerpo en una muestra.
- En varias realizaciones del método, el anticuerpo de interés comprende un anticuerpo biespecífico.
- 15 En varias realizaciones del método, el marcador detectable comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente o un marcador bioluminiscente.
- En varias realizaciones del método, la muestra incluye un patrón interno.
- 20 En varias realizaciones del método, la inmovilización comprende fotoinmovilización, inmovilización química o inmovilización térmica.
- En varias realizaciones del método, los uno o más capilares comprenden una matriz de separación.
- 25 En varias realizaciones del método, la matriz de separación comprende anfolitos portadores.
- En varias realizaciones del método, la matriz de separación comprende una matriz de tamizado configurada para separar proteínas por peso molecular.
- 30 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar contaminantes proteicos de interés en una muestra de preparación de anticuerpos, en el que el método incluye: separar componentes proteicos de una muestra mediante un parámetro físico en uno o más capilares usando electroforesis capilar; inmovilizar los componentes proteicos de la muestra dentro del uno o más capilares; poner en contacto los componentes proteicos dentro de uno o más capilares con dos o más anticuerpos primarios que se unen específicamente a un contaminante proteico de interés; y detectar la unión de los dos o más anticuerpos primarios, detectando de este modo contaminantes proteicos de interés en la muestra de preparación de anticuerpos.
- 35 En algunas realizaciones, el método incluye además discriminar entre variantes del contaminante proteico de interés en la muestra de preparación de anticuerpos mediante el parámetro físico.
- 40 En varias realizaciones del método, los uno o más capilares comprenden una matriz de separación.
- En varias realizaciones del método, la matriz de separación comprende anfolitos portadores.
- 45 En varias realizaciones del método, el parámetro físico comprende la carga.
- En varias realizaciones del método, la matriz de separación comprende una matriz de tamizado configurada para separar proteínas por peso molecular.
- 50 En varias realizaciones del método, el parámetro físico comprende el peso molecular.
- En varias realizaciones del método, los dos o más anticuerpos primarios están marcados con un marcador detectable, en donde la detección de la unión de los dos o más anticuerpos primarios comprende la detección del marcador detectable.
- 55 En varias realizaciones del método, la detección de la unión de los dos o más anticuerpos primarios incluye además: poner en contacto los dos o más anticuerpos primarios con un anticuerpo secundario que se une específicamente a por lo menos uno de los dos o más anticuerpos primarios, y en donde el anticuerpo secundario tiene un marcador detectable; y detectar el marcador detectable.
- 60 En algunas realizaciones, el método incluye además la detección y/o discriminación entre variantes de carga o tamaño de los contaminantes proteicos de interés.
- 65 En algunas realizaciones, el método incluye además determinar una cantidad relativa o absoluta de los contaminantes proteicos de interés.

En varias realizaciones del método, el marcador detectable comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente o un marcador bioluminiscente.

5 En varias realizaciones del método, la muestra incluye un patrón interno.

En varias realizaciones del método, la inmovilización comprende fotoinmovilización, inmovilización química o inmovilización térmica.

10 En varias realizaciones del método, los dos o más anticuerpos primarios comprenden anticuerpos policlonales.

En varias realizaciones del método, los contaminantes proteicos de interés comprenden PLBD2.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar y/o discriminar entre anticuerpos en una mezcla de dos o más anticuerpos en una muestra por un parámetro físico, en el que el método incluye: separar componentes proteicos de una muestra que comprende dos o más anticuerpos de interés por carga en uno o más capilares usando electroforesis capilar; inmovilizar los componentes proteicos de la muestra dentro del uno o más capilares; poner en contacto los componentes proteicos dentro de uno o más capilares con un primer anticuerpo primario que se une específicamente a un primer anticuerpo de interés; detectar la unión del primer anticuerpo primario, detectando de este modo el primer anticuerpo de interés; poner en contacto los componentes proteicos dentro de uno o más capilares con un segundo anticuerpo primario que se une específicamente a un segundo anticuerpo de interés; y detectar la unión del segundo anticuerpo primario, detectando de este modo el segundo anticuerpo de interés y discriminando entre los anticuerpos de una muestra.

20 25 En algunas realizaciones, el método incluye además poner en contacto los componentes proteicos dentro de uno o más capilares con un tercer anticuerpo primario que se une específicamente a un tercer anticuerpo de interés; detectar la unión del tercer anticuerpo primario, detectando de este modo el tercer anticuerpo de interés.

30 En algunas realizaciones, el método incluye además poner en contacto los componentes proteicos dentro de uno o más capilares con uno o más anticuerpos primarios adicionales que se unen específicamente a uno o más anticuerpos adicionales de interés; y detectar la unión del uno o más anticuerpos primarios adicionales, detectando de este modo los anticuerpos adicionales de interés.

35 En varias realizaciones del método, los anticuerpos primarios están marcados con un marcador detectable, y en donde la detección de la unión de los anticuerpos primarios comprende la detección del marcador detectable.

40 En varias realizaciones del método, la detección de la unión de los anticuerpos primarios comprende: poner en contacto los anticuerpos primarios con un anticuerpo secundario que se une específicamente a los anticuerpos primarios, y en donde el anticuerpo secundario tiene un marcador detectable; y detectar el marcador detectable.

En algunas realizaciones, el método incluye además determinar una cantidad relativa o absoluta de los anticuerpos de interés en la mezcla.

45 En varias realizaciones del método, el marcador detectable comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente o un marcador bioluminiscente.

En varias realizaciones del método, la muestra incluye un patrón interno.

50 En varias realizaciones del método, la inmovilización comprende fotoinmovilización, inmovilización química o inmovilización térmica.

En varias realizaciones del método, el uno o más capilares comprenden una matriz de separación.

55 En varias realizaciones del método, la matriz de separación comprende anfolitos portadores.

En varias realizaciones, pueden combinarse cualquiera de las características o componentes de las realizaciones analizadas anteriormente o en la presente, y tales combinaciones se incluyen dentro del alcance de la presente divulgación. Cualquier valor específico analizado anteriormente o en la presente puede combinarse con otro valor relacionado analizado anteriormente o en la presente para recitar un intervalo con los valores que representan los extremos superior e inferior del intervalo, y tales intervalos se abarcan dentro del alcance de la presente divulgación.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

El expediente de patente o de solicitud contiene por lo menos un dibujo realizado en color. La Oficina facilitará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con el dibujo o dibujos en color tras la petición y pago de la tasa correspondiente.

- 5 La Figura 1 es un diagrama de un flujo de trabajo ejemplar para la separación y detección de proteínas mediante electroforesis capilar por peso molecular aproximado.
- La Figura 2A es un gráfico de trazas que muestra un análisis de fragmentos de anticuerpos por CE-Western usando anticuerpos anti Kappa y anti FC. Este resultado demuestra que el CE-Western basado en el tamaño puede cuantificar de manera sensible las variantes de tamaño en muestras de mAb.
- 10 La Figura 2B es un gráfico que muestra el análisis de fragmentos de anticuerpos por CE-Western usando el análisis de proteína total. Este resultado demuestra que el análisis CE-Western basado en el tamaño puede cuantificar con sensibilidad las variantes de tamaño en las muestras de mAb.
- La Figura 3A es un gráfico de barras de la cantidad relativa de los fragmentos de anticuerpos como se muestra en la Figura 2A.
- 15 La Figura 3B es un gráfico de barras de la cantidad relativa de los fragmentos de anticuerpos como se muestra en la Figura 2B.
- La Figura 4 muestra dos gráficos que demuestran que el análisis de fragmentos de anticuerpos mediante CE-Western basado en el tamaño es comparable al análisis de fragmentos de anticuerpos mediante CE-SDS.
- 20 La Figura 5A es un gráfico del análisis en condiciones no reductoras que muestra que el grupo de proceso de mAb2 ejemplar tiene especies de PLBD2 muy similares a las de PLBD2 recombinante.
- La Figura 5B es un gráfico del análisis en condiciones reductoras que muestra que el grupo de proceso de mAb2 ejemplar tiene especies de PLBD2 muy similares a las de PLBD2 recombinante.
- 25 La Figura 6 muestra un conjunto de gráficos que demuestran un análisis dependiente de la concentración de PLBD2 en condiciones reductoras y no reductoras. Este resultado muestra que la cuantificación de PLBD2 en muestras de preparación de anticuerpos mediante CE-Western basada en el tamaño es comparable a la medición por ELISA.
- La Figura 7 es un diagrama de un flujo de trabajo ejemplar para la separación y detección de proteínas mediante electroforesis capilar por carga.
- 30 La Figura 8 muestra que los resultados de CIEF por imagen (iCIEF) y CE-Western son comparables para una preparación de anticuerpos. Se obtuvieron perfiles de variantes de carga comparables tanto por iCIEF como por iCIEF-Western. Este resultado demuestra que iCIEF-Western es un sustituto viable de iCIEF para el análisis de anticuerpos.
- 35 La Figura 9A es un gráfico que muestra que el CE-western basado en la carga (iCIEF-western) es capaz de determinar la concentración relativa de especies individuales de anticuerpos en una muestra con anticuerpos secundarios dirigidos a los anticuerpos individuales.
- La Figura 9B es similar al gráfico de la Figura 9A, pero con la curva compuesta eliminada para mostrar las especies de anticuerpos individuales.
- 40 La Figura 10 muestra un conjunto de gráficos que ilustran el análisis de un cóctel de fármacos de tres componentes de anticuerpos usando iCIEF, que muestra que los intervalos de pl de las variantes individuales de carga de los anticuerpos se solapan. Este resultado demuestra que iCIEF está mal equipado para el análisis de preparaciones complejas de anticuerpos que probablemente tengan pls solapadas.
- La Figura 11 muestra un conjunto de gráficos y tablas para el análisis de las especies individuales del cóctel de fármacos de tres componentes de anticuerpos contra fármacos de la Figura 10, como se analizaron usando CE-Western basado en carga (iCIEF-Western) y usando anticuerpos secundarios dirigidos a los anticuerpos individuales del cóctel. Se añadió TEMED (0,25%) para mover las tres variantes de carga de anticuerpos a la ventana de detección del capilar. Este resultado demuestra que iCIEF-Western puede utilizarse para analizar cócteles complejos de anticuerpos.
- 45 La Figura 12 es un gráfico compuesto que muestra que iCIEF-Western tiene la capacidad de detectar selectivamente los anticuerpos individuales en un producto farmacéutico combinado.
- 50 La Figura 13 muestra gráficos y una tabla que demuestran que el análisis cuantitativo de mAb4 es similar por sí mismo evaluado mediante iCIEF Y iCIEF-Western y en la combinación evaluada mediante iCIEF-Western.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

- 55 Antes de describir la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente es sólo con el propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. Cualquiera de las realizaciones o características de realizaciones pueden combinarse entre sí, y tales combinaciones se incluyen expresamente en el alcance de la presente invención.

60 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Como se usa en la presente, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico enumerado particular, significa que el valor puede variar del valor enumerado en no más del 1%. Por ejemplo, como

se usa en la presente, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

5 Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente puede usarse en la puesta en práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones no relacionadas con patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

10 **Abreviaturas usadas en la presente**

10	mAb: Anticuerpo monoclonal
	biAb: Anticuerpo biespecífico
	CQA: Atributos críticos de calidad
15	CE: Electroforesis capilar
	SDS: dodecil sulfato de sodio
	iCIEF: CIEF por imagen
	iCIEF-Western; CE-Western basado en la carga
	IEC: Cromatografía de intercambio iónico
20	QC: Control de calidad
	HRP: peroxidasa de rábano picante
	HCP: Proteínas de la célula huésped

25 **Definiciones**

25 El término "anticuerpo", como se usa en la presente, hace referencia a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro (es decir, "moléculas de anticuerpo completas"), así como a multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM) o a fragmentos de unión a antígenos de los mismos. Cada cadena pesada está formada por una región variable de cadena pesada ("HCVR" o "V_H") y una región constante de cadena pesada (formada por los dominios C_H1, C_H2 y C_H3). En varias realizaciones, la cadena pesada puede ser un isotipo IgG. En algunos casos, la cadena pesada se selecciona entre IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, la cadena pesada es de isotipo IgG1 o IgG4, incluyendo opcionalmente una región bisagra químérica de isotipo IgG1/IgG2 o IgG4/IgG2. Cada cadena ligera incluye una región variable de cadena ligera ("LCVR" o "V_L") y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo amino terminal a extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El término "anticuerpo" hace referencia a inmunoglobulinas tanto glicosiladas como no glicosiladas de cualquier isotipo o subclase. El término "anticuerpo" incluye moléculas de anticuerpo preparadas, expresadas, creadas o aisladas por medios recombinantes, como anticuerpos aislados de una célula huésped transfectada para expresar el anticuerpo. Para una revisión de la estructura de los anticuerpos, consultar Lefranc et al., IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains, 27(1) Dev. Comp. Immunol. 55-77 (2003); y M. Potter, Structural correlates of immunoglobulin diversity, 2(1) Surv. Immunol. Res. 27-42 (1983).

45 El término anticuerpo también abarca un "anticuerpo biespecífico", que incluye una inmunoglobulina heterotetramérica que puede unirse a más de un epítopo diferente. Una mitad del anticuerpo biespecífico, que incluye una única cadena pesada y una única cadena ligera y seis CDR, se une a un antígeno o epítopo, y la otra mitad del anticuerpo se une a un antígeno o epítopo diferente. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico puede unirse al mismo antígeno, pero a epítopos diferentes o a epítopos no solapados. En algunos casos, ambas mitades del anticuerpo biespecífico tienen cadenas ligeras idénticas pero conservan la especificidad dual. Los anticuerpos biespecíficos se describen en general en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2010/0331527 (30 de diciembre de 2010).

55 El término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o "fragmento de anticuerpo"), se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente formado por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), que consiste en un dominio VH, (vi) una CDR aislada, y (vii) un scFv, que consiste en los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, unidos por un conector sintético para formar una cadena proteica única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes. Otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, como los diacuerpos, también se engloban bajo el término "anticuerpo" (consultar, por ejemplo, Holliger et al. (1993) 90 PNAS U.S.A. 6444-6448; y Poljak et al. (1994) 2 Structure 1121-1123).

Además, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden obtenerse mediante técnicas estándar de ADN recombinante comúnmente conocidas en la técnica (consultar Sambrook et al., 1989).

- 5 Se pretende que el término "anticuerpo humano" incluya anticuerpos con regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los mAbs humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular en la CDR3. Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, incluya mAbs en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (por ejemplo, ratón), se han injertado en secuencias FR humanas. El término incluye anticuerpos producidos recombinantemente en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. No se pretende que el término incluya anticuerpos aislados de o generados en un sujeto humano.
- 10
- 15 El término "muestra", como se usa en la presente, se refiere a una mezcla de moléculas que incluye por lo menos un polipéptido de interés, como un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo biespecífico, que se somete a manipulación de acuerdo con los métodos de la invención incluyendo, por ejemplo, la separación, el análisis, la extracción, la concentración o la realización de perfiles.
- 20 Los términos "análisis" o "analizando", como se usan en la presente, se usan indistintamente y se refieren a cualquiera de los varios métodos de separación, detección, aislamiento, purificación, solubilización, detección y/o caracterización de moléculas de interés (por ejemplo, polipéptidos, como anticuerpos) y contaminantes en preparaciones de anticuerpos.
- 25 "Cromatografía", como se usa en la presente, se refiere al proceso de separación de una mezcla, por ejemplo, una mezcla que contiene péptidos, proteínas, polipéptidos y/o anticuerpos, como anticuerpos monoclonales. Consiste en hacer pasar una mezcla a través de una fase estacionaria, que separa las moléculas de interés de otras moléculas de la mezcla y permite aislar una o más moléculas de interés. En el método divulgado en la presente, la chromatografía se refiere a la electroforesis capilar, incluyendo la electroforesis capilar basada en el tamaño y la electroforesis capilar basada en el enfoque isoelectrónico o en la carga.
- 30
- 35 "Poner en contacto", como se usa en la presente, incluye juntar por lo menos dos sustancias en solución o fase sólida, por ejemplo, poner en contacto una muestra con un anticuerpo, como un anticuerpo que se une específicamente a una molécula de interés, como un anticuerpo terapéutico o potencialmente terapéutico.
- 40 El término "aislado", como se usa en la presente, se refiere a un componente biológico (como un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal) que se ha separado sustancialmente, producido aparte de, o purificado lejos de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente se produce de manera natural o se expresa transgénicamente, es decir, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas, lípidos y metabolitos. Los ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, lípidos y metabolitos que han sido "aislados" incluyen, por tanto, los ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, lípidos y metabolitos purificados mediante métodos de purificación estándar o no estándar. El término también abarca ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, lípidos y metabolitos preparados por expresión recombinante en una célula huésped, así como péptidos, lípidos, metabolitos y ácidos nucleicos sintetizados químicamente.
- 45 Los términos "péptido", "proteína" y "polipéptido" se refieren, indistintamente, a un polímero de aminoácidos y/o análogos de aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos o miméticos de enlaces peptídicos. Los veinte aminoácidos naturales y sus designaciones de una y tres letras son los siguientes: Alanina A Ala; Cisteína C Cys; Ácido aspártico D Asp; Ácido glutámico E Glu; Fenilalanina F Phe; Glicina G Gly; Histidina H His; Isoleucina I He; Lisina K Lys; Leucina L Leu; Metionina M Met; Asparagina N Asn; Prolina P Pro; Glutamina Q Gln; Arginina R Arg; Serina S Ser; Treonina Tr; Valina V Val; Triptófano W Trp; y Tirosina Y Tyr. En una realización, un péptido es un anticuerpo o fragmento o parte del mismo, por ejemplo, cualquiera de los fragmentos o cadenas de anticuerpos enumerados anteriormente. En algunas realizaciones, el péptido puede modificarse postraduccionalmente.
- 50
- 55 "Detectar" y "detección" tienen su significado estándar, y se pretende que abarquen la detección incluyendo la presencia o ausencia, medición y/o caracterización de una proteína de interés, como un mAb o una proteína contaminante.
- 60 Como se usan en la presente, los términos "proteína de interés" y/o "proteína objetivo de interés" se refieren a cualquier proteína que se vaya a separar y/o detectar con los métodos proporcionados en la presente. Las proteínas de interés adecuadas incluyen anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales, y otras proteínas, como proteínas contaminantes en preparaciones de anticuerpos.
- 65 Como se usan en la presente, los términos "estándar" y/o "estándar interno" se refieren a una sustancia bien caracterizada de cantidad y/o identidad conocidas (por ejemplo, peso molecular o perfil de movilidad electroforética

conocidos) que puede añadirse a una muestra y tanto el estándar como las moléculas de la muestra, sobre la base del peso molecular o del punto isoelectrónico por electroforesis). Una comparación del estándar proporciona entonces una medida cuantitativa o semicuantitativa de la cantidad de analito, como mAb o proteína contaminante presente en la muestra.

5 **Descripción general**

La caracterización de las variantes de anticuerpos monoclonales (mAb) es importante para identificar su impacto potencial sobre la seguridad, potencia y estabilidad de un potencial anticuerpo terapéutico. Por ejemplo, para 10 que las agencias reguladoras consideren su aprobación, debe realizarse una caracterización exhaustiva de la molécula. En los productos farmacéuticos que comprenden mezclas de anticuerpos, debe determinarse la caracterización de las cantidades absolutas o relativas de cada anticuerpo. Como los agregados y los fragmentos 15 pueden afectar potencialmente a la inmunogenicidad y la potencia, sus niveles se monitorizan típicamente durante la liberación, la estabilidad y la caracterización del lote. Además, se determinan las vías primarias de degradación de la molécula y las impurezas y variantes relacionadas con el producto. Se usa con frecuencia cromatografía de intercambio iónico (IEC) acoplada a la detección UV para separar y cuantificar las variantes de mAb en el control de calidad (QC) rutinario. Sin embargo, la caracterización de los picos cromatográficos resultantes de una separación IEC 20 es un proceso que requiere mucho tiempo. Por tanto, se necesitan métodos adicionales para caracterizar los mAb terapéuticos potenciales y los contaminantes potenciales de las preparaciones de mAb. Los métodos divulgados en la presente satisfacen esas necesidades.

En la presente se divulga un método para detectar y/o discriminar entre variantes de un anticuerpo monoclonal (mAb) en una muestra mediante un parámetro físico, como el peso molecular o el punto isoelectrónico del mAb. Los métodos divulgados pueden usarse en la evaluación de control de calidad de preparaciones de anticuerpos. 25 En algunas realizaciones del método, una muestra que incluye un mAb de interés se resuelve o separa usando electroforesis capilar, por ejemplo en uno o más capilares de un sistema CE. En ciertas realizaciones, la muestra se resuelve o separa por peso molecular. La resolución por peso molecular permite determinar qué fragmentos o especies 30 de anticuerpos están presentes en la muestra, por ejemplo cadenas pesadas o ligeras no apareadas además del mAb completamente formado (en las Figuras 2A y 2B se muestran ejemplos de ello). En ciertas realizaciones, la muestra se resuelve o separa por carga, por ejemplo mediante enfoque isoelectrónico. La separación del mAb por carga tiene la ventaja añadida de poder determinar la homogeneidad del mAb, por ejemplo, cambios en la carga superficial del mAb 35 que pueden no verse fácilmente en la separación por peso molecular. En ciertas realizaciones, la muestra se resuelve o separa dentro de un único capilar. En ciertas realizaciones, la muestra se resuelve o separa dentro de múltiples capilares, por ejemplo en paralelo. Una vez que los componentes proteicos se han resuelto o separado en uno o más capilares, los componentes proteicos, por ejemplo el mAb de interés, se inmovilizan dentro del capilar de manera que 40 se mantiene la posición relativa del mAb de interés en el uno o más capilares. En realizaciones, el mAb de interés se detecta poniendo en contacto los componentes proteicos dentro de uno o más capilares, incluyendo el mAb de interés, con dos o más anticuerpos primarios que se unen específicamente al mAb de interés para detectar la presencia del mAb de interés. En realizaciones, el método incluye detectar la unión de los dos o más anticuerpos primarios, por 45 ejemplo porque su movilidad en el capilar se ve afectada por la inmovilización del mAb de interés. La detección de la unión del anticuerpo primario, por ejemplo a lo largo de la longitud de un capilar, permite detectar y/o discriminar entre variantes de tamaño y/o cambio del mAb de interés en la muestra, dependiendo de si la muestra se sometió a separación por masa o carga, respectivamente. A modo de ejemplo, con respecto a la separación por peso molecular, cuanto más pequeño sea el fragmento de un mAb, más lejos se espera que se desplace dentro de un capilar. En 50 algunas realizaciones, la muestra puede contener múltiples, como por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5 o más mAb de interés, cada uno de los cuales puede detectarse usando un anticuerpo primario que se une específicamente al mAb individual de interés. En algunas realizaciones, el método incluye además determinar una cantidad relativa o absoluta de las variantes del anticuerpo monoclonal en una muestra, por ejemplo mediante la medición de la altura o el área del pico, que corresponde a la cantidad de anticuerpo primario marcado detectado y, por lo tanto, cuánto mAb de interés está disponible para unirse al anticuerpo primario marcado. En algunas 55 realizaciones, el anticuerpo monoclonal de interés comprende un anticuerpo monoclonal biespecífico. En algunas realizaciones, los dos o más anticuerpos primarios comprenden por lo menos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una cadena pesada del anticuerpo de interés. En algunas realizaciones, los dos o más anticuerpos primarios comprenden por lo menos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una cadena ligera del anticuerpo de interés. En el contexto de anticuerpos biespecíficos, el anticuerpo o anticuerpos primarios pueden dirigirse contra diferentes cadenas pesadas para identificar especies que comprenden homodímeros no deseados y las especies heterodiméricas deseadas. En algunas realizaciones, los dos o más anticuerpos primarios comprenden por lo menos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente tanto a una cadena ligera como a una cadena pesada del anticuerpo de interés. En algunas realizaciones, los dos o más anticuerpos primarios comprenden por lo menos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una o más de las CDR del anticuerpo de interés. En 60 algunas realizaciones, la muestra incluye uno o más estándares internos, por ejemplo una escalera de estándares de peso molecular, una escalera de estándares de punto isoelectrónico, o incluso un estándar usado como valor de referencia o punto de referencia para determinar la cantidad de un mAb de interés en la muestra.

65 La capacidad de discriminar entre mAbs en un cóctel de mAb de múltiples mAbs se está volviendo cada vez

más importante a medida que estas terapias de componentes múltiples demuestran una mayor eficacia en el tratamiento de enfermedades. Por tanto, los métodos mejorados de monitorización de cómo se comportan los mAbs individuales en estos sistemas serán cada vez más importantes en la evaluación de la compatibilidad y estabilidad de estas terapias multi-mAb. Para satisfacer esta necesidad creciente, la presente divulgación proporciona un método 5 para detectar y/o discriminar entre anticuerpos monoclonales en una mezcla de dos o más anticuerpos monoclonales en una muestra.

En realizaciones, el método incluye separar componentes proteicos de una muestra con dos o más mAbs de 10 interés, como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 o incluso más, mAbs de interés, por carga en uno o más capilares usando electroforesis capilar, por ejemplo por enfoque isoelectrónico. En realizaciones, el método incluye inmovilizar los componentes proteicos de la muestra dentro de uno o más capilares. En realizaciones, el método incluye poner en 15 contacto los componentes proteicos dentro de uno o más capilares con un primer anticuerpo primario que se une específicamente a un primer anticuerpo monoclonal de interés. En algunas realizaciones, el método incluye detectar la unión del primer anticuerpo primario, detectando de este modo el primer anticuerpo monoclonal de interés. En algunas realizaciones, puede crearse un perfil basado en la carga o huella dactilar de los mAbs de interés, por ejemplo del mAb de interés solo para comparación con un perfil basado en la carga o huella dactilar de los mAbs en la mezcla. Esta comparación puede usarse luego para determinar si el mAb de interés cambia en la mezcla. Esta comparación de perfil o huella dactilar puede realizarse para cualquiera o todos los mAbs de interés en la mezcla. En realizaciones, el método incluye poner en contacto los componentes proteicos dentro del uno o más capilares con un segundo 20 anticuerpo primario que se une específicamente a un segundo anticuerpo monoclonal de interés. En realizaciones, el método incluye detectar la unión del segundo anticuerpo primario, detectando de este modo el segundo anticuerpo monoclonal de interés y discriminando entre los anticuerpos monoclonales en una muestra. Esto puede continuarse para múltiples mAbs diferentes en la muestra. Por ejemplo, en realizaciones, el método puede incluir poner en contacto los componentes proteicos dentro de uno o más capilares con un tercer anticuerpo primario que se une específicamente a un tercer anticuerpo monoclonal de interés y detectar la unión del tercer anticuerpo primario, 25 detectando de este modo el tercer anticuerpo monoclonal de interés. En realizaciones adicionales, el método puede incluir poner en contacto los componentes proteicos dentro de uno o más capilares con uno o más anticuerpos primarios adicionales, por ejemplo un 4º, 5º, 6º, 7º, etc. anticuerpo primario, que se une específicamente a uno o más anticuerpos monoclonales adicionales de interés, por ejemplo un 4º, 5º, 6º, 7º, etc. anticuerpo monoclonal adicional de interés, y detectar la unión de uno o más anticuerpos primarios adicionales, detectando de este modo los 30 anticuerpos monoclonales adicionales de interés. En realizaciones, la muestra se divide en múltiples capilares y cada uno de estos capilares se pone en contacto con uno o varios anticuerpos primarios diferentes y se detecta. Las señales obtenidas pueden combinarse posteriormente, por ejemplo como se muestra en la Figura 12. En ciertas realizaciones, la detección puede tener lugar en un único capilar, por ejemplo en multiplexación, como se describe a continuación.

Además de la caracterización de los mAbs descrita anteriormente, comprender la naturaleza de los contaminantes proteicos es otro factor importante en el desarrollo de terapias mAb. Por ejemplo, el control de la 35 proteína A residual, el HCP, el ADN residual y otros posibles residuos de cultivo o purificación suelen formar parte de la memoria descriptiva de la sustancia farmacéutica. Además, dicho control proporciona información valiosa sobre la consistencia y el rendimiento del proceso. Por tanto, en la presente se divulan métodos de detección basados en el tamaño y/o la carga de las proteínas de células huésped (HCP), por ejemplo usando anticuerpos, como anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para las HCP, por ejemplo, proteínas contaminantes de interés. Los métodos divulgados permiten la detección y visualización de HCP problemáticos y sus varias especies en muestras de proceso. 40 Estos métodos permiten la capacidad de detectar y mostrar las varias especies de una impureza de HCP dada a niveles bajos de ppm. Por tanto, aspectos de la presente divulgación incluyen además un método para detectar contaminantes proteicos de interés en una muestra de preparación de anticuerpos monoclonales. En realizaciones, el método incluye separar componentes proteicos de una muestra mediante un parámetro físico en uno o más capilares usando electroforesis capilar. En realizaciones, el método incluye inmovilizar los componentes proteicos de la muestra dentro de uno o más capilares. En realizaciones, el método incluye poner en contacto los componentes proteicos 45 dentro de uno o más capilares con dos o más anticuerpos primarios que se unen específicamente a un contaminante proteico de interés. En realizaciones, el método incluye detectar la unión de los dos o más anticuerpos primarios, detectando de este modo los contaminantes proteicos de interés en una muestra de preparación de anticuerpos monoclonales. En algunas realizaciones, el método incluye además discriminar entre variantes de un contaminante proteico de interés en una muestra de preparación de anticuerpos monoclonales mediante el parámetro físico. En 50 realizaciones, la proteína de interés es una proteína contaminante de interés o más de una proteína contaminante de interés, que puede detectarse con dos o más anticuerpos primarios, por ejemplo anticuerpos monoclonales o incluso anticuerpos policlonales. En algunas realizaciones, el método incluye detectar y/o discriminar entre variantes de carga o tamaño de las proteínas contaminantes de interés. En algunas realizaciones, puede determinarse una cantidad relativa o absoluta de los contaminantes proteicos de interés. En algunas realizaciones, los contaminantes proteicos 55 de interés comprenden PLBD2.

Las muestras para su uso en los métodos divulgados pueden ser heterogéneas y contener una variedad de componentes, es decir, diferentes proteínas. Alternativamente, la muestra puede ser homogénea, conteniendo un componente o esencialmente un componente de múltiples especies de carga o peso molecular. Antes de detectar la proteína de interés, como un mAb o una proteína contaminante, la muestra puede someterse a un procesamiento

previo al análisis. Por ejemplo, la muestra puede someterse a un paso de lisis, paso de desnaturalización, paso de calentamiento, paso de purificación, paso de precipitación, paso de inmunoprecipitación, paso de cromatografía en columna, centrifugación, etc. En algunas realizaciones, la separación de la muestra y la inmovilización pueden llevarse a cabo en sustratos nativos. En otras realizaciones, la muestra puede someterse a desnaturalización, por ejemplo, calor y/o contacto con un agente desnaturalizante. Los agentes desnaturalizantes son conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la muestra puede someterse a condiciones no reductoras. En algunas realizaciones, la muestra puede someterse a condiciones reductoras, por ejemplo ponerse en contacto con uno o más agentes reductores. Los agentes reductores son conocidos en la técnica.

10 En algunas realizaciones, los anticuerpos primarios están marcados con un marcador detectable y la detección de la unión de los dos o más anticuerpos primarios comprende la detección del marcador detectable. En algunas realizaciones, la detección de la unión de los dos o más anticuerpos primarios incluye poner en contacto los dos o más anticuerpos primarios con un anticuerpo secundario que se une específicamente por lo menos a uno de los dos o más anticuerpos primarios y detectar la unión del anticuerpo secundario. En realizaciones, el anticuerpo secundario tiene un marcador detectable y se detecta el marcador detectable.

15 En algunas realizaciones, los anticuerpos primarios y/o secundarios incluyen uno o más marcadores detectables. En algunas realizaciones, el marcador detectable comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente o un marcador bioluminiscente. En algunas realizaciones, el marcador detectable incluye un marcador quimioluminiscente. El marcador quimioluminiscente puede incluir cualquier entidad que proporcione una señal luminosa y que pueda usarse de acuerdo con los métodos divulgados en la presente. En la técnica se conocen una variedad de tales marcadores quimioluminiscentes, consultar, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 6,689,576, 6,395,503, 6,087,188, 6,287,767, 6,165,800, y 6,126,870. Los marcadores adecuados incluyen enzimas capaces de reaccionar con un sustrato quimioluminiscente de tal manera que se induce la emisión de fotones por quimioluminiscencia. Tales enzimas inducen la quimioluminiscencia en otras moléculas a través de la actividad enzimática. Tales enzimas pueden incluir peroxidasa, como peroxidasa de rábano picante (HRP), beta-galactosidasa, fosfatasa u otras para las que se disponga de un sustrato quimioluminiscente. En algunas realizaciones, el marcador quimioluminiscente puede seleccionarse de cualquiera de una variedad de clases de marcador de luminol, un marcador de isoluminol, etc. En algunas realizaciones, los anticuerpos primarios incluyen anticuerpos marcados quimioluminiscentes. En la técnica se conocen los sustratos quimioluminiscentes, como el sustrato Galacton disponible de Applied Biosystems de Foster City, Calif. o el sustrato SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity disponible de Pierce Biotechnology, Inc. de Rockford, Ill. u otros sustratos adecuados.

20 En algunas realizaciones, el marcador detectable incluye un compuesto bioluminiscente. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de un compuesto bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes adecuados incluyen, entre otros, la luciferina, la luciferasa y la aequorina.

25 En algunas realizaciones, el marcador detectable incluye un marcador fluorescente, como un colorante fluorescente. Un colorante fluorescente puede incluir cualquier entidad que proporcione una señal fluorescente y que pueda usarse de acuerdo con los métodos y dispositivos descritos en la presente. Típicamente, el colorante fluorescente incluye un sistema de resonancia-deslocalizado o un sistema de anillo aromático que absorbe luz a una primera longitud de onda y emite luz fluorescente a una segunda longitud de onda en respuesta al evento de absorción.

30 En la técnica se conocen una amplia variedad de tales moléculas de colorantes fluorescentes. Por ejemplo, los colorantes fluorescentes pueden seleccionarse entre una gran variedad de clases de compuestos fluorescentes, entre los que se incluyen xantenos, rodaminas, fluoresceínas, cianinas, ftalocianinas, escuarinas, colorantes bodipy, cumarinas, oxazinas y carbopironinas. En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando los anticuerpos primarios y/o secundarios contienen fluoróforos, como colorantes fluorescentes, su fluorescencia se detecta excitándolos con una fuente de luz apropiada, y monitorizando su fluorescencia mediante un detector sensible a su longitud de onda de emisión de fluorescencia característica. En algunas realizaciones, los anticuerpos primarios incluyen anticuerpos marcados con colorantes fluorescentes.

35 En realizaciones, usando dos o más anticuerpos primarios o secundarios diferentes, que se unen o interactúan con diferentes proteínas de interés, como diferentes mAbs o proteínas contaminantes de interés, pueden detectarse simultáneamente diferentes tipos de proteínas de interés, por ejemplo en multiplexación dentro del mismo capilar o de un único capilar, por ejemplo usando un marcador detectable diferente o incluso el mismo. En algunas realizaciones, pueden detectarse simultáneamente dos o más anticuerpos primarios y/o secundarios diferentes que se unen o interactúan con la proteína de interés. A modo de ejemplo no limitativo, un primer anticuerpo primario que se une a una cadena pesada de un mAb de interés que tiene un primer marcador detectable puede detectarse con un segundo anticuerpo primario que se une a una cadena ligera de un mAb de interés que tiene un segundo marcador detectable diferente del primer marcador detectable, de tal manera que los dos marcadores pueden detectarse en multiplexación. En algunas realizaciones, pueden usarse múltiples anticuerpos primarios y/o secundarios con múltiples sustratos para proporcionar multiplexación cromática. Por ejemplo, los diferentes sustratos quimioluminiscentes usados se seleccionarían de forma que emitan fotones de diferente color. La detección selectiva de diferentes colores

puede lograrse usando una rejilla de difracción, un prisma, una serie de filtros de color u otros medios.

En algunas realizaciones, el capilar puede incluir una matriz de separación, que puede ser añadida de manera automatizada por el aparato y/o sistema. En algunas realizaciones, la muestra se carga en una matriz de apilamiento antes de la separación. La matriz de separación, en una realización, es una matriz de separación por tamaños, y tiene propiedades similares o sustancialmente las mismas de un gel polimérico, usado en técnicas de electroforesis convencionales. La electroforesis capilar en la matriz de separación es análoga a la separación en un gel polimérico, como un gel de poliacrilamida o un gel de agarosa, en donde las moléculas se separan sobre la base del tamaño de las moléculas de la muestra, proporcionando un paso poroso a través del cual pueden desplazarse las moléculas. La matriz de separación permite la separación de moléculas por tamaño molecular porque las moléculas más grandes se desplazarán más lentamente a través de la matriz que las moléculas más pequeñas. En algunas realizaciones, el uno o más capilares comprenden una matriz de separación. En algunas realizaciones, la muestra que contiene una proteína de interés se separa o resuelve sobre la base del peso molecular. En algunas realizaciones, la matriz de separación comprende una matriz de tamizado configurada para separar proteínas por peso molecular. En algunas realizaciones, los componentes proteicos de una muestra se separan por peso molecular y el método es un método de detección y/o discriminación entre variantes de tamaño del anticuerpo monoclonal de interés. En algunas realizaciones, los componentes proteicos de una muestra se separan por peso molecular y el método es un método de detección y/o discriminación entre variantes de tamaño de una proteína contaminante de interés.

En la técnica se conocen una amplia variedad de sustratos en fase sólida, por ejemplo geles, como el gel de poliacrilamida. En algunas realizaciones, la resolución de una o más proteínas de interés incluye la electroforesis de una muestra en un gel polimérico. La electroforesis en un gel polimérico, como un gel de poliacrilamida o un gel de agarosa, separa moléculas sobre la base del tamaño de la molécula. Un gel polimérico proporciona un conducto poroso a través del cual pueden desplazarse las moléculas. Los geles poliméricos permiten la separación de moléculas por tamaño molecular porque las moléculas más grandes se desplazan más lentamente a través del gel que las moléculas más pequeñas.

En algunas realizaciones, la muestra que contiene una proteína de interés se separa o resuelve basándose en la carga de los componentes de la muestra. En algunas realizaciones, los componentes proteicos de una muestra se separan por carga y el método es un método de detección y/o discriminación entre variantes de carga de un anticuerpo monoclonal de interés. En algunas realizaciones, los componentes proteicos de una muestra se separan por carga y el método es un método de detección y/o discriminación entre variantes de carga de una proteína contaminante de interés. En algunas realizaciones, la matriz de separación comprende anfolitos portadores. En algunas realizaciones, la separación de una muestra por carga incluye el enfoque isoelectrónico (IEF) de una muestra. Por ejemplo, en un campo eléctrico, una molécula migrará hacia el polo (cátodo o ánodo) que lleva una carga opuesta a la carga neta que lleva la molécula. Esta carga neta depende en parte del pH del medio en el que migra la molécula. Un procedimiento electroforético común consiste en establecer soluciones con diferentes valores de pH en cada extremo de un campo eléctrico, con un intervalo de gradiente de pH intermedio. A un cierto pH, se obtiene el punto isoelectrónico de una molécula y la molécula no lleva carga neta. A medida que la molécula atraviesa el gradiente de pH, alcanza un punto en el que su carga neta es cero (es decir, su punto isoelectrónico) y a partir de entonces queda inmovilizada en el campo eléctrico. Por tanto, este procedimiento de electroforesis separa las moléculas de acuerdo con sus diferentes puntos isoelectrónicos.

En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando la resolución es por enfoque isoelectrónico, puede cargarse un reactivo anfolito en uno o más capilares de un dispositivo de electroforesis capilar. Un reactivo anfolito es una mezcla de moléculas que tienen diferentes puntos isoelectrónicos. Los reactivos anfolitos típicos son Pharmalyte™ y Ampholine™ disponibles de Amersham Biosciences de Buckinghamshire, Inglaterra.

En realizaciones, una vez que se ha completado la separación, los componentes de la muestra separada (por ejemplo, incluyendo la proteína de interés, como un mAb o una proteína contaminante de interés) se inmovilizan a una pared o paredes del uno o más capilares usando cualquier método adecuado, incluyendo pero no limitado a tratamiento químico, fotoquímico y térmico. En algunas realizaciones, los componentes de la muestra separada se inmovilizan en uno o más capilares de un sistema CE después de que las moléculas se hayan separado por electroforesis, por ejemplo por tamaño o carga. En algunas realizaciones, la inmovilización comprende fotoinmovilización, inmovilización química o inmovilización térmica. La inmovilización puede realizarse mediante enlaces covalentes o no covalentes, como por ejemplo mediante una interacción hidrófoba o iónica. En ciertas realizaciones, la proteína o proteínas de interés se inmovilizan usando una o más fracciones reactivas. La fracción reactiva puede incluir cualquier grupo reactivo capaz de formar un enlace covalente con un grupo reactivo correspondiente de moléculas individuales de la muestra. Por tanto, la fracción reactiva puede incluir cualquier grupo reactivo conocido en la técnica, siempre que sea compatible con los métodos divulgados en la presente. En algunas realizaciones, la fracción reactiva incluye un grupo reactivo capaz de formar un enlace covalente con un grupo reactivo correspondiente de una proteína de interés, como un mAb o una proteína contaminante de interés.

La fracción reactiva puede unirse directa o indirectamente al capilar. En algunas realizaciones, la fracción reactiva puede suministrarse en solución o suspensión, y puede formar puentes entre la pared del capilar y las

moléculas de la muestra tras su activación. Por ejemplo, en una realización, la inmovilización se produce sometiendo la muestra separada y los capilares a luz ultravioleta (UV), que sirve para inmovilizar la proteína o proteínas de interés (si están presentes en la muestra) y las moléculas de la muestra a las paredes del capilar. La inmovilización puede realizarse mediante enlaces covalentes o mediante medios no covalentes, como una interacción hidrófoba o iónica.

- 5 En otra realización, puede usarse una fracción reactiva para inmovilizar covalentemente la proteína resuelta de interés o las proteínas de interés resueltas en el capilar. La fracción reactiva puede unirse directa o indirectamente al capilar (por ejemplo, en la pared o paredes del tubo capilar). En algunas realizaciones, la fracción reactiva puede suministrarse en solución o suspensión, y puede configurarse para formar puentes entre la pared del capilar y las moléculas de la muestra tras su activación. La fracción reactiva puede revestir el capilar o estar presente en un polímero lineal o 10 reticulado en el capilar, que puede unirse o no a la pared del capilar antes y/o después de la activación. La fracción reactiva puede ser y/o incluir cualquier grupo reactivo capaz de formar un enlace covalente con un grupo reactivo correspondiente de moléculas individuales de la muestra como, por ejemplo, los descritos anteriormente.

15 En algunas realizaciones, la fracción reactiva incluye un grupo funcional que puede convertirse en una funcionalidad que se adhiere a una proteína de interés a través de interacciones hidrófobas, interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, etc. En algunas realizaciones, tales moléculas reactivas se activan con luz UV, láser, temperatura o cualquier otra fuente de energía para inmovilizar la proteína de interés en las superficies del capilar y/o en las superficies de las partículas unidas a las superficies del capilar. En algunas realizaciones, las superficies del capilar se funcionalizan con polímeros térmicamente sensibles que permiten cambios en la hidrofobicidad de las 20 superficies tras cambiar la temperatura. En algunas realizaciones, las proteínas de interés se inmovilizan en tales superficies aumentando la hidrofobicidad de un polímero que responde a la temperatura cuando se alcanza una determinada temperatura dentro del capilar.

25 En la técnica se conocen una amplia variedad de fracciones reactivas adecuadas para enlazar covalentemente dos moléculas. Por ejemplo, la fracción reactiva puede unirse a los enlaces carbono-hidrógeno (C-H) de las proteínas. Como muchos medios de separación también contienen componentes con enlaces C-H, los productos químicos que reaccionan con grupos sulfhidrilo (S-H) pueden ser ventajosos, ya que los grupos S-H se encuentran únicamente en las proteínas en relación con la mayoría de los componentes de los medios de separación. 30 Las fracciones reactivas adecuadas incluyen, entre otras, grupos fotorreactivos, grupos reactivos químicos y grupos termorreactivos. La fotoinmovilización en el sistema capilar puede lograrse mediante la activación de uno o más grupos fotorreactivos. Un grupo fotorreactivo incluye uno o más grupos fotorreactivos latentes que al ser activados por una fuente de energía externa, forman un enlace covalente con otras moléculas. Consultar, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº. 5,002,582 y 6,254,634. Los grupos fotorreactivos generan especies activas como radicales libres y, en particular, nitrenos, carbonos y estados excitados de cetonas tras la absorción de energía electromagnética. 35 Pueden elegirse grupos fotorreactivos que respondan a varias partes del espectro electromagnético, como los que responden a las partes ultravioleta, infrarroja y visible del espectro. Por ejemplo, tras la exposición a una fuente de luz, el grupo fotorreactivo puede activarse para formar un enlace covalente con una molécula adyacente. Los grupos fotorreactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, arilcetonas, azidas, diazos, diazirinas y quinonas. En algunas 40 realizaciones, las proteínas de interés resueltas de la muestra se inmovilizan en el capilar de un sistema de CE mediante enfoque isoelectrónico.

45 La detección de un marcador detectable puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, siempre que sea compatible con los métodos descritos en la presente. La detección del marcador puede realizarse monitorizando una señal usando métodos e instrumentos convencionales, ejemplos no limitativos incluyen, un fotodetector, una matriz de fotodetectores, una matriz de dispositivos acoplados cargados (CCD), etc. Típicamente, la detección del marcador detectable incluye la imagenología del capilar. En algunas realizaciones, puede obtenerse una imagen de toda la longitud del capilar. Alternativamente, puede obtenerse una imagen de una parte o porción distinta del capilar.

50 Los expertos en la materia podrán variar fácilmente el orden de los pasos de los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, puede separarse la muestra y luego inmovilizar la proteína o proteínas de interés en sus localizaciones resueltas en el capilar, antes de poner en contacto la proteína o proteínas de interés con los anticuerpos primarios. En algunas realizaciones, los anticuerpos primarios se ponen en contacto con la proteína o proteínas de interés para formar un complejo y luego el complejo se resuelve en el capilar de un sistema de CE. En algunas 55 realizaciones, los anticuerpos primarios podrían ser precargados en la muestra y posteriormente se cargan en el sistema. Como otro ejemplo, puede aplicarse el paso de resolución, como el enfoque isoelectrónico, después de suministrar los reactivos quimioluminiscentes.

60 En algunas realizaciones, la muestra incluye un estándar interno. Los estándares internos sirven para calibrar la separación con respecto al punto isoelectrónico o al peso molecular. Los estándares internos para IEF son bien conocidos en la técnica; consultar, por ejemplo, Shimura, K., Kamiya, K., Matsumoto, H., y K. Kasai (2002) Fluorescence-Labeled Peptide pI Markers for Capillary Isoelectric Focusing, *Analytical Chemistry* v74: 1046-1053, y la Patente de Estados Unidos Nº 5,866,683. Los estándares a detectar por fluorescencia pueden iluminarse antes o 65 después de la quimioluminiscencia, pero generalmente no al mismo tiempo que la quimioluminiscencia. En algunas realizaciones, la proteína de interés y los estándares se detectan por fluorescencia. La proteína de interés y los

estándares pueden marcarse con colorantes fluorescentes detectables a longitudes de onda de emisión discretas, de tal manera que la proteína de interés y los estándares sean detectables de manera independiente.

En algunas realizaciones, un estándar interno puede ser una forma purificada de la propia proteína de interés, que generalmente se distingue de la proteína de interés de alguna manera. Los métodos para obtener una forma purificada de la proteína de interés pueden incluir, entre otros, la purificación a partir de la naturaleza, la purificación a partir de organismos cultivados en el laboratorio (por ejemplo, mediante síntesis química), y/o similares. La característica distintiva de un estándar interno puede ser cualquier cambio adecuado que puede incluir, pero no se limita a, marcado con colorante, radiomarcado, o modificación de la movilidad del estándar durante la separación electroforética para que se separe de la proteína de interés. Por ejemplo, un estándar puede contener una modificación de la proteína de interés que cambie la carga, la masa y/o la longitud (por ejemplo, mediante delección, fusión y/o modificación química) del estándar con respecto a la proteína de interés. Por tanto, tanto la proteína de interés como el patrón interno pueden marcarse con colorantes fluorescentes detectables a longitudes de onda de emisión discretas, permitiendo de este modo que la proteína de interés y el estándar sean detectables de manera independiente. En algunos casos, un estándar interno es diferente de la proteína de interés, pero se comporta de manera similar o igual que la proteína de interés, permitiendo mediciones comparativas relevantes. En algunas realizaciones, un estándar adecuado para su uso puede ser cualquiera de los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2007/0062813.

Como apreciarán los expertos en la técnica, puede realizarse prácticamente cualquier método de carga de la muestra en el capilar. Por ejemplo, la muestra puede cargarse en un extremo del capilar. En algunas realizaciones, la muestra se carga en un extremo del capilar mediante flujo hidrodinámico. Por ejemplo, en las realizaciones en las que la trayectoria del fluido es un capilar, la muestra puede cargarse en un extremo del capilar mediante flujo hidrodinámico, de tal manera que el capilar se usa como micropipeta. En algunas realizaciones, la muestra puede cargarse en el capilar por electroforesis, por ejemplo, cuando el capilar está lleno de gel y, por lo tanto, es más resistente al flujo hidrodinámico.

El capilar puede incluir cualquier estructura que permita que las moléculas líquidas o disueltas fluyan. Por tanto, el capilar puede incluir cualquier estructura conocida en la técnica, siempre que sea compatible con los métodos. En algunas realizaciones, el capilar es un orificio o canal a través del cual puede fluir una molécula líquida o disuelta. En algunas realizaciones, el capilar es un pasaje en un material permeable en el que pueden fluir líquidos o moléculas disueltas.

El capilar incluye cualquier material que permita la detección de la proteína de interés dentro del capilar. El capilar incluye cualquier material conveniente, como vidrio, plástico, silicona, sílice fundida, gel o similares. En algunas realizaciones, el método emplea una pluralidad de capilares. Una pluralidad de capilares permite analizar simultáneamente múltiples muestras.

El capilar puede variar en cuanto a dimensiones, anchura, profundidad y sección transversal, así como en cuanto a la forma, pudiendo ser redondeado, trapezoidal, rectangular, etc., por ejemplo. El capilar puede ser recto, redondeado, serpenteante o similar. Como se describe a continuación, la longitud de la trayectoria del fluido depende en parte de factores como el tamaño de la muestra y el grado de separación de la muestra necesario para resolver la proteína de interés.

En algunas realizaciones, el capilar incluye un tubo con un orificio. En algunas realizaciones, el método emplea una pluralidad de capilares. Los tamaños adecuados incluyen, pero no se limitan a, capilares que tienen diámetros internos de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 µm, aunque más típicamente pueden utilizarse capilares que tienen diámetros internos de aproximadamente 25 a aproximadamente 400 µm. Los capilares de menor diámetro usan cargas de muestra relativamente bajas, mientras que el uso de capilares de diámetro interior relativamente grande permite cargas de muestra relativamente altas y puede dar como resultado una mejor detección de la señal.

Los capilares pueden tener longitudes variables. Las longitudes adecuadas incluyen, pero no se limitan a, capilares de aproximadamente 2 a 20 cm de longitud, aunque pueden usarse capilares algo más cortos y más largos. En algunas realizaciones, el capilar tiene aproximadamente 3, 4, 5 o 6 cm de longitud. Los capilares más largos típicamente dan como resultado mejores separaciones y una mejor resolución de mezclas complejas. Los capilares más largos pueden ser especialmente útiles para resolver proteínas de interés de baja abundancia.

Generalmente, los capilares están compuestos de sílice fundida, aunque pueden utilizarse capilares de plástico y PYREX (es decir, vidrio amorfo). Como se ha indicado anteriormente, no es necesario que los capilares tengan forma redonda o tubular. También pueden usarse otras formas, siempre que sean compatibles con los métodos descritos en la presente.

En algunas realizaciones, el capilar puede ser un canal. En algunas realizaciones, el método emplea una pluralidad de canales. En algunas realizaciones, el capilar puede ser un canal en un dispositivo microfluídico. La

microfluídica emplea canales en un sustrato para realizar una amplia variedad de operaciones. Los dispositivos microfluídicos pueden incluir uno o una pluralidad de canales contorneados en una superficie de un sustrato. El dispositivo microfluídico puede obtenerse a partir de un sustrato sólido inerte, y en algunas realizaciones en forma de chip. Las dimensiones del dispositivo microfluídico no son críticas, pero en algunas realizaciones las dimensiones son del orden de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 5 mm de espesor y aproximadamente de 1 centímetro a aproximadamente 20 centímetros de lado. Los tamaños adecuados incluyen, pero no se limitan a, canales que tienen una profundidad de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 200 μm , aunque más típicamente puede usarse con una profundidad de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 50 μm . También pueden usarse canales más pequeños, como microcanales o nanocanales, siempre que sean compatibles con los métodos.

Aunque anteriormente se han descrito en detalle algunas realizaciones específicas, la descripción sólo tiene propósitos de ilustración.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar características particulares de ciertas realizaciones. Sin embargo, las características particulares descritas a continuación no deben considerarse como limitaciones al alcance de la invención, sino más bien como ejemplos a partir de los cuales los expertos en la técnica reconocerán equivalentes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Cuantificación de variantes de tamaño en muestras de mAb por CE-Western

Las muestras que contenían una preparación de anticuerpo purificado de mAb1 se sometieron a separación CE por peso molecular (consultar la Figura 1) usando un dispositivo PeggySue obtenido de ProteinSimple, San Jose, CA. Las separaciones resultantes se analizaron usando anticuerpos anti-Kappa y anti-FC (Figura 2A) o mediante ensayo de proteína total (consultar más adelante). Como se muestra en la Figura 2A, el uso de los anticuerpos para las cadenas ligeras y pesadas de mAb1 permitió la identificación de las variantes de tamaño en la muestra de acuerdo con el peso molecular, así como la determinación de la cantidad relativa de cada una de las variantes de tamaño. Como se muestra en la Figura 2B, los resultados mostrados en la Figura 2A fueron los mismos que los obtenidos en un ensayo de proteína total, es decir, en donde se determina la señal fluorescente de cualquier proteína de la muestra. La Figura 2B en combinación con la Figura 2A demuestra que las variantes de tamaño pueden cuantificarse usando la detección de anticuerpos y que cualquier sesgo en la detección basada en anticuerpos puede confirmarse usando el ensayo de proteína total. Además, este resultado demuestra que el CE-Western basado en tamaño puede cuantificar con sensibilidad las variantes de tamaño en muestras de mAb. Las Figuras 3A y 3B muestran las cantidades relativas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos detectados.

Ensayo de tamaño

La reconstitución de la mezcla fluorescente estándar, DTT, escalera y luminol se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La condición estándar de preparación de muestras es calentarlas a 95° C durante 5 minutos. Para la resolución necesaria, las muestras se calentaron a 80° C durante 10 minutos. Además, se optimizaron los parámetros del instrumento para mejorar la resolución cambiando el tiempo de apilamiento y de carga de la muestra. Aunque el fabricante recomienda usar una matriz de apilamiento de 15 segundos seguido de un tiempo de carga de la muestra de 9 segundos, la condición estándar actual es una matriz de apilamiento de 12 segundos seguido de un tiempo de carga de la muestra de 6 segundos, lo que mejoró significativamente la resolución entre el pico de 150 kDa y el de 125 kDa en la caracterización de la variante de tamaño del anticuerpo.

Ensayo de proteína total:

En los métodos optimizados divulgados en la presente, la biotinilación en línea de las muestras en el módulo de ensayo de tamaño se realizó sin tener que usar el módulo de ensayo de proteína total. Esto proporcionó la capacidad de realizar el ensayo de proteína total en paralelo con el ensayo de tamaño dentro del mismo ciclo, lo que no es posible de otro modo.

Como segundo enfoque, se usaron muestras prebiotiniladas en lugar de la biotinilación en línea para mejorar la sensibilidad del método. Además de mejorar la sensibilidad, nos permite ejecutar el ensayo de proteína total en paralelo al ensayo de tamaño dentro del mismo ciclo eliminando el uso del kit de proteína total y el módulo.

Ejemplo 2

Comparación de CE-Western y CE-SDS

Las muestras que contenían mAb1 se sometieron o al análisis CE-SDS o al análisis CE-Western basado en

el tamaño. Como se muestra en la Figura 4, el análisis CE-Western basado en el tamaño proporcionó una resolución comparable a la del análisis CE-SDS. Además, como el análisis CE-Western basado en el tamaño usó dos anticuerpos diferentes, es posible determinar qué variante de tamaño da lugar a qué pico en el análisis (el panel derecho es un compuesto de dos trazas, una en la que la muestra resuelta se sondó con un anticuerpo anti-Kappa o un anticuerpo anti-FC). Estos resultados demuestran que la CE Western basada en el tamaño es una alternativa viable a la CE-SDS en el análisis de variantes de tamaño de mAb.

Ejemplo 3

10 Determinación de contaminantes de muestras en preparaciones de mAb

Se analizó una preparación de anticuerpos que incluía el contaminante PLBD2 mediante CE-Western basado en el tamaño tanto en condiciones no reductoras (Figura 5A) como reductoras (Figura 5B). La Figura 5A es un gráfico del análisis en condiciones no reductoras que muestra que el grupo del proceso de mAb2 tiene especies de PLBD2 muy similares a las del PLBD2 recombinante. La Figura 5B es un gráfico del análisis en condiciones reductoras que muestra que el grupo de procesos de mAb2 tiene especies PLBD2 muy similares a las del PLBD2 recombinante. La Figura 6 es un conjunto de gráficos que muestran un análisis dependiente de la concentración de PLBD2 en condiciones reductoras y no reductoras, lo que demuestra que el CE-western basado en el tamaño es comparable a una medición de ELISA para la detección y cuantificación de contaminantes de la preparación de mAb. Además, a diferencia de ELISA, como las proteínas contaminantes pueden resolverse por peso molecular, pueden determinarse las especies individuales que contribuyen a la contaminación global.

Ejemplo 4

25 Separación y detección con carga basada en CE-Western

Para demostrar que el CE-Western basado en la carga (iCIEF-Western; consultar la Figura 7) era comparable al iCIEF en la resolución de variantes de carga de mAb, se sometieron muestras que incluían mAb3 a análisis iCIEF e iCIEF-Western. Como se muestra en la Figura 8, el iCIEF y el iCIEF-Western dieron resultados comparables para una preparación de anticuerpos. Este resultado demuestra que el iCIEF-Western es un sustituto viable de iCIEF para el análisis de anticuerpos. Además, como se muestra en las Figuras 9A y 9B, como el iCIEF-Western puede usar anticuerpos dirigidos a las variantes específicas, los niveles y la identidad de las variantes pueden determinarse simultáneamente.

35 Ensayo de carga

La reconstitución de la premezcla G2, DTT y escalera se llevó a cabo según lo sugerido por el fabricante. De acuerdo con el protocolo estándar, se recomienda realizar la dilución de la muestra en la mezcla de diluyente de muestra e inhibidor DMSO. Sin embargo, en el método optimizado divulgado en la presente, la muestra se diluye en el tampón CHAPS/lisis antes de añadirla a la mezcla previa de G2 y a la mezcla de escalera pl. Además, se incluyó TEMED como aditivo en la preparación de la muestra cuando se trabaja con moléculas con pl básico alto para llevar el perfil de variante de carga dentro de la ventana de detección. La sensibilidad del método se mejoró adicionalmente usando luminol de tamaño en lugar de luminol de carga, según fuera necesario.

45 Se usó el método optimizado para detectar y cuantificar fármacos individuales dentro de los productos combinados. Además, el método se usó para comprender las diferencias en las variantes de carga que se unen al ligando.

Ejemplo 5

50 Análisis de mezclas complejas de mAb

55 Los métodos iCIEF-Western divulgados en la presente proporcionan una potente herramienta para analizar una mezcla compleja de anticuerpos. La Figura 10 muestra que un cóctel de fármacos de anticuerpos de tres componentes analizado usando iCIEF contiene intervalos de pl solapados de variantes de carga de anticuerpos individuales. Este resultado demuestra que el iCIEF está mal equipado para el análisis de preparaciones complejas de anticuerpos que probablemente tengan pls solapadas. Sin embargo, como se muestra en la Figura 11, el CE-Western basado en la carga (iCIEF-Western) puede aprovecharse para discriminar entre las especies individuales del cóctel de fármacos de anticuerpos de tres componentes. La Figura 12 ilustra un gráfico compuesto que muestra que el iCIEF-Western tiene la potencia para detectar selectivamente los anticuerpos individuales en el producto farmacéutico combinado. Como se muestra en la Figura 13, el análisis cuantitativo de mAb4 es similar por sí mismo evaluado usando iCIEF e iCIEF-Western, y en la combinación evaluada usando iCIEF-Western.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar y/o discriminar entre variantes de un anticuerpo en una muestra mediante un parámetro físico, que comprende:

separar los componentes proteicos de una muestra que contiene un anticuerpo de interés por peso molecular o carga en uno o más capilares usando electroforesis capilar;

inmovilizar los componentes proteicos de la muestra dentro del uno o más capilares;

poner en contacto los componentes proteicos dentro del uno o más capilares con dos o más anticuerpos primarios que se unen específicamente al anticuerpo de interés; y

detectar la unión de los dos o más anticuerpos primarios,

caracterizada por la detección y/o discriminación entre variantes de tamaño o variantes de carga del anticuerpo de interés en la muestra.

2. El método de la reivindicación 1, en donde los dos o más anticuerpos primarios comprenden por lo menos un anticuerpo que se une específicamente a una cadena pesada del anticuerpo de interés.

3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde los dos o más anticuerpos primarios comprenden por lo menos un anticuerpo que se une específicamente a una cadena ligera del anticuerpo de interés.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde los dos o más anticuerpos primarios están marcados con un marcador detectable, y en donde la detección de la unión de los dos o más anticuerpos primarios comprende la detección del marcador detectable.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la detección de la unión de los dos o más anticuerpos primarios comprende:

poner en contacto los dos o más anticuerpos primarios con un anticuerpo secundario que se une específicamente por lo menos a uno de los dos o más anticuerpos primarios, y en donde el anticuerpo secundario tenga un marcador detectable; y

detectar el marcador detectable.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde los componentes proteicos de una muestra se separan por carga y el método es un método de detección y/o discriminación entre variantes de carga del anticuerpo de interés.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde los componentes proteicos de una muestra se separan por peso molecular y el método es un método de detección y/o discriminación entre variantes de tamaño del anticuerpo de interés.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la muestra comprende uno o más anticuerpos adicionales de interés.

9. El método de la reivindicación 8, en donde se detectan uno o más anticuerpos de interés adicionales.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además determinar una cantidad relativa o absoluta de las variantes del anticuerpo en una muestra.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el anticuerpo de interés comprende un anticuerpo biespecífico.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el marcador detectable comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente o un marcador bioluminiscente.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la muestra incluye un estándar interno.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la inmovilización comprende fotoinmovilización, inmovilización química o inmovilización térmica.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el uno o más capilares comprenden una matriz de separación.

16. El método de la reivindicación 15, en donde la matriz de separación comprende anfolitos portadores.

17. El método de la reivindicación 15, en donde la matriz de separación comprende una matriz de tamizado configurada

para separar proteínas por peso molecular.

18. Un método para detectar y/o discriminar entre contaminantes proteicos de interés en una muestra de preparación de anticuerpos, que comprende:

5 separar los componentes proteicos de una muestra mediante un parámetro físico en uno o más capilares usando la electroforesis capilar;
 inmovilizar los componentes proteicos de la muestra dentro del uno o más capilares;
 10 poner en contacto los componentes proteicos dentro del uno o más capilares con dos o más anticuerpos primarios que se unen específicamente a un contaminante proteico de interés; y
 detectar la unión de los dos o más anticuerpos primarios,
 caracterizada por la detección y/o discriminación de contaminantes proteicos de interés en una muestra de preparación de anticuerpos.

15 19. El método de la reivindicación 18, que comprende además discriminar entre variantes de un contaminante proteico de interés en una muestra de preparación de anticuerpos mediante el parámetro físico.

20 20. El método de la reivindicación 18 o 19, en donde el uno o más capilares comprenden una matriz de separación.

25 21. El método de la reivindicación 20, en donde la matriz de separación comprende anfolitos portadores.

26 22. El método de la reivindicación 21, en donde el parámetro físico comprende la carga.

30 23. El método de la reivindicación 20, en donde la matriz de separación comprende una matriz de tamizado configurada para separar proteínas por peso molecular.

35 24. El método de la reivindicación 23, en donde el parámetro físico comprende el peso molecular.

36 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-24, en donde los dos o más anticuerpos primarios están marcados con un marcador detectable, y en donde la detección de la unión de los dos o más anticuerpos primarios comprende la detección del marcador detectable.

40 26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-24, en donde la detección de la unión de los dos o más anticuerpos primarios comprende:

45 poner en contacto los dos o más anticuerpos primarios con un anticuerpo secundario que se une específicamente por lo menos a uno de los dos o más anticuerpos primarios, y en donde el anticuerpo secundario tiene un marcador detectable; y
 detectar el marcador detectable.

50 27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-26, que comprende además detectar y/o discriminar entre variantes de carga o tamaño de los contaminantes proteicos de interés.

55 28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-27, que comprende además determinar una cantidad relativa o absoluta de los contaminantes proteicos de interés.

60 29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-28, en donde el marcador detectable comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente o un marcador bioluminiscente.

65 30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-29, en donde la muestra incluye un estándar interno.

66 31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-30, en donde la inmovilización comprende fotoinmovilización, inmovilización química o inmovilización térmica.

70 32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-31, en donde los dos o más anticuerpos primarios comprenden anticuerpos policlonales.

75 33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-32, en donde los contaminantes proteicos de interés comprenden PLBD2.

76 34. Un método para detectar y/o discriminar entre anticuerpos en una mezcla de dos o más anticuerpos en una muestra mediante un parámetro físico, que comprende:

80 separar los componentes proteicos de una muestra que comprende dos o más anticuerpos de interés por carga en uno o más capilares usando electroforesis capilar;

- inmovilizar los componentes proteicos de la muestra dentro del uno o más capilares;
poner en contacto los componentes proteicos dentro del uno o más capilares con un primer anticuerpo primario que se une específicamente a un primer anticuerpo de interés;
detectar la unión de un primer anticuerpo primario;
5 poner en contacto los componentes proteicos dentro del uno o más capilares con un segundo anticuerpo primario que se une específicamente a un segundo anticuerpo de interés; y
detectar la unión del segundo anticuerpo primario,
caracterizado por la detección del primer anticuerpo de interés y del segundo anticuerpo de interés y la discriminación entre los anticuerpos en una muestra.
- 10 35. El método de la reivindicación 34, que comprende además poner en contacto los componentes proteicos dentro del uno o más capilares con un tercer anticuerpo primario que se une específicamente a un tercer anticuerpo de interés;
detectar la unión del tercer anticuerpo primario, detectando de este modo el tercer anticuerpo de interés.
- 15 36. El método de la reivindicación 35, que comprende además poner en contacto los componentes proteicos dentro del uno o más capilares con uno o más anticuerpos primarios adicionales que se unen específicamente a uno o más anticuerpos adicionales de interés;
detectar la unión del uno o más anticuerpos primarios adicionales, detectando de este modo los anticuerpos adicionales de interés.
- 20 37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 34-36, en donde los anticuerpos primarios están marcados con un marcador detectable, y en donde la detección de la unión de los anticuerpos primarios comprende la detección del marcador detectable.
- 25 38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 34-36, en donde la detección de la unión de los anticuerpos primarios comprende:
30 poner en contacto los anticuerpos primarios con un anticuerpo secundario que se une específicamente a los anticuerpos primarios, y en donde el anticuerpo secundario tenga un marcador detectable; y
detectar el marcador detectable.
- 35 39. El método de cualquiera de las reivindicaciones 34-38, que comprende además determinar una cantidad relativa o absoluta de uno o más de los anticuerpos de interés.
- 40 40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 34-39, en donde el marcador detectable comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente o un marcador bioluminiscente.
- 45 41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 34-40, en donde la muestra incluye un estándar interno.
42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la inmovilización comprende fotoinmovilización, inmovilización química o inmovilización térmica.
43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 34-40, en donde el uno o más capilares comprenden una matriz de separación.
44. El método de la reivindicación 43, en donde la matriz de separación comprende anfolitos portadores.

FIG. 1

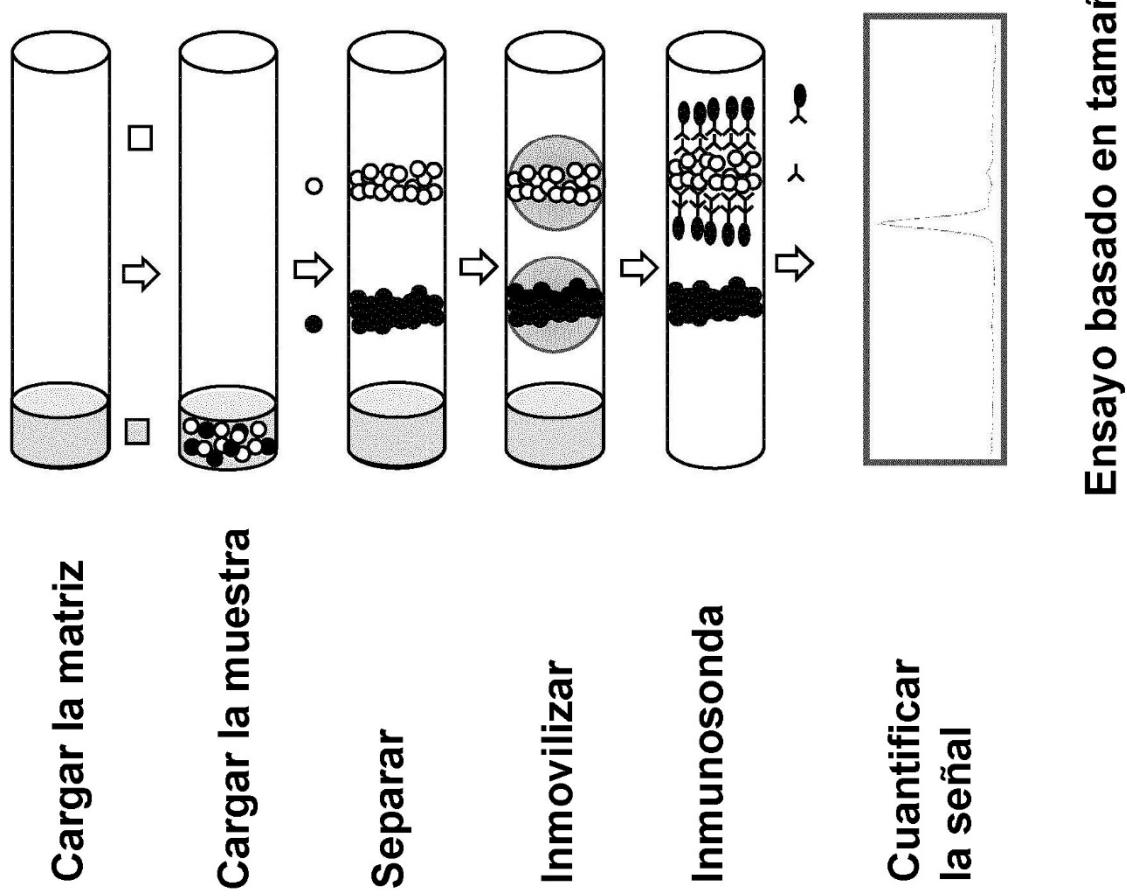


FIG. 2A

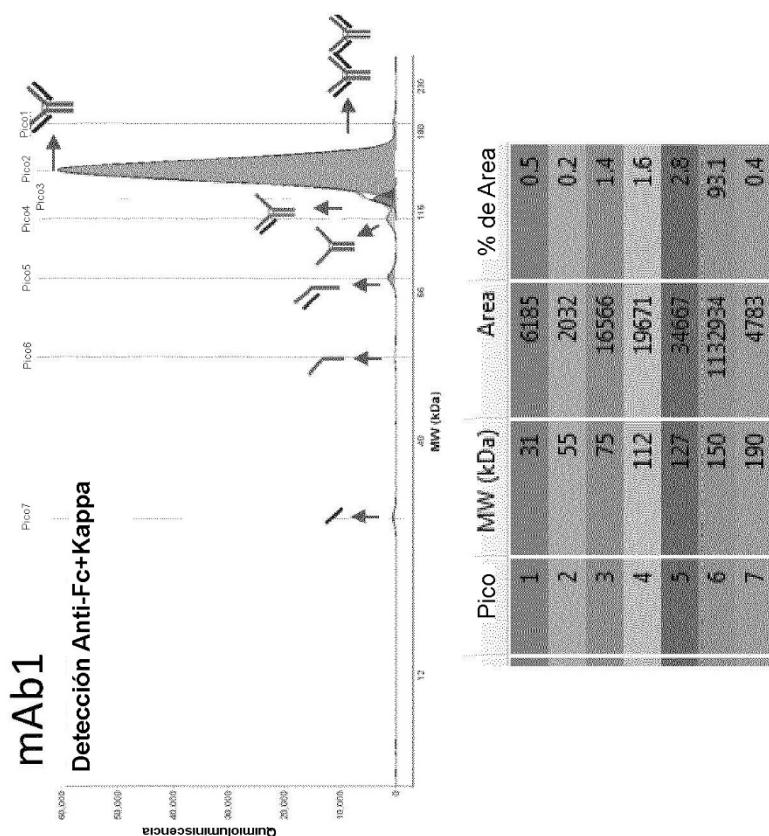


FIG. 2B

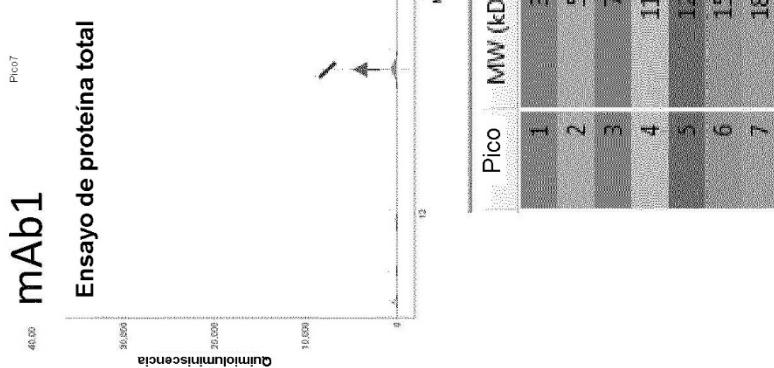


FIG. 3A

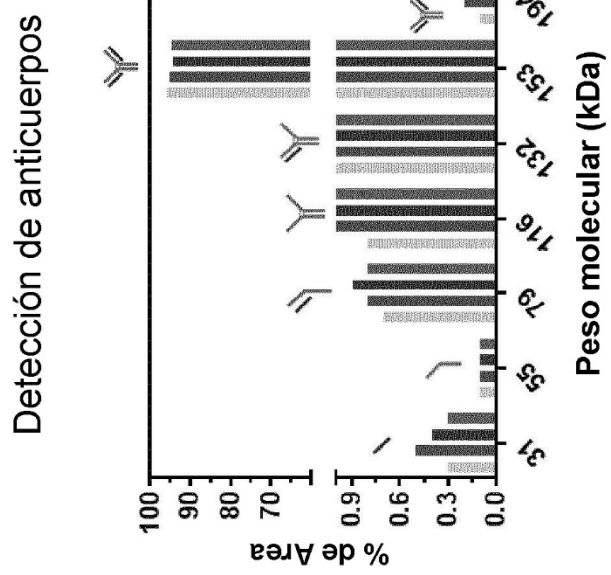
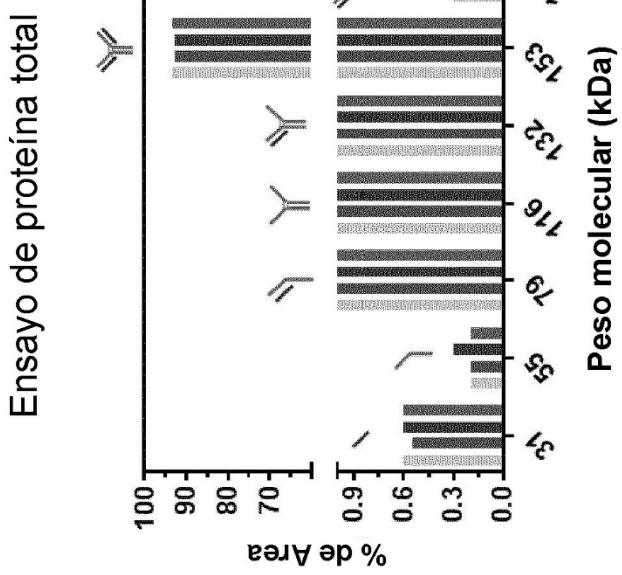


FIG. 3B



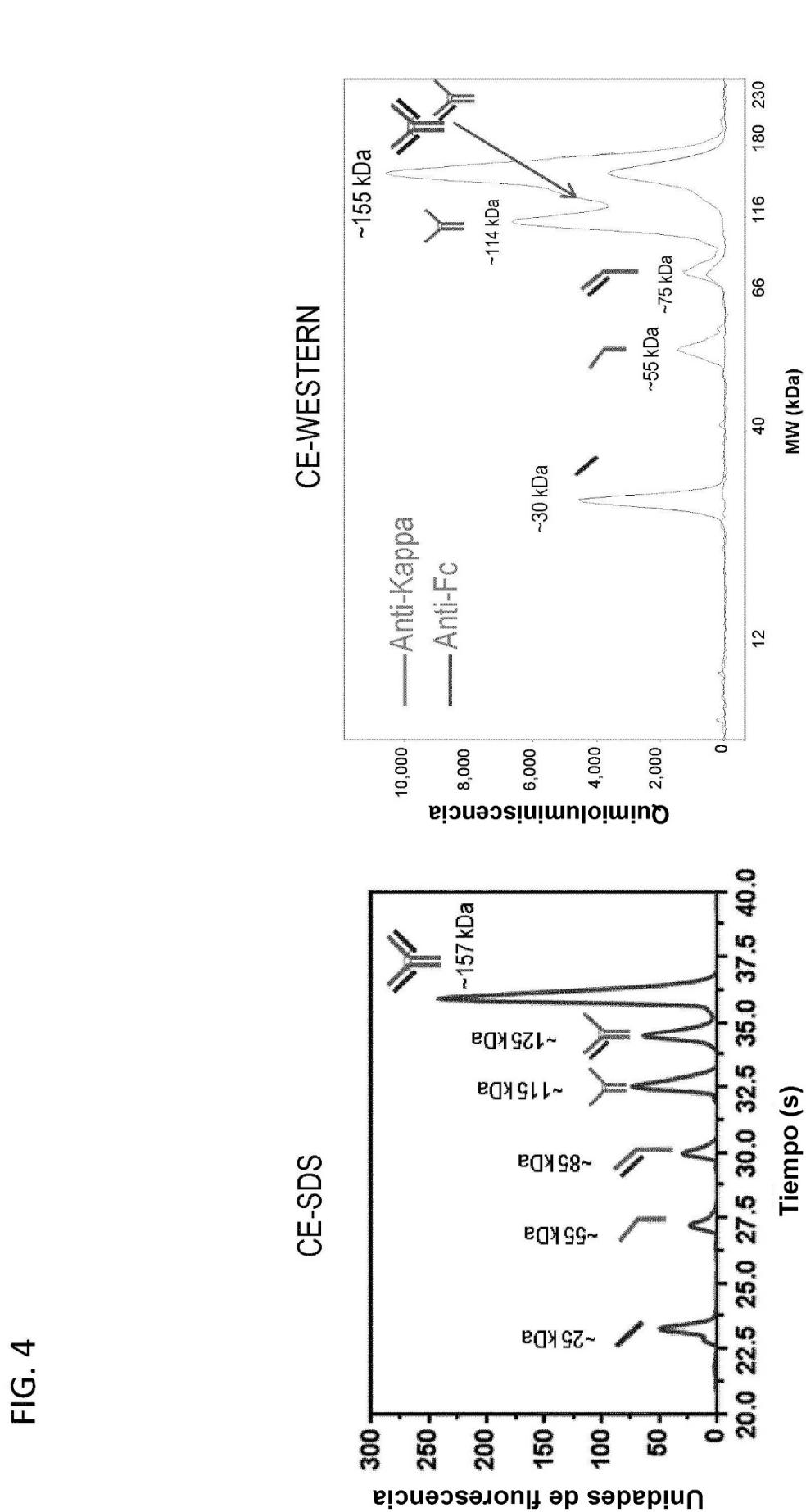


FIG. 5A

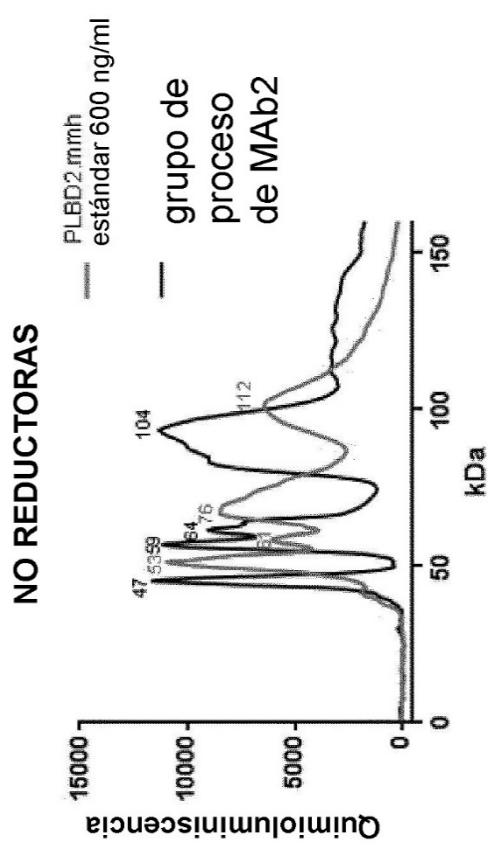
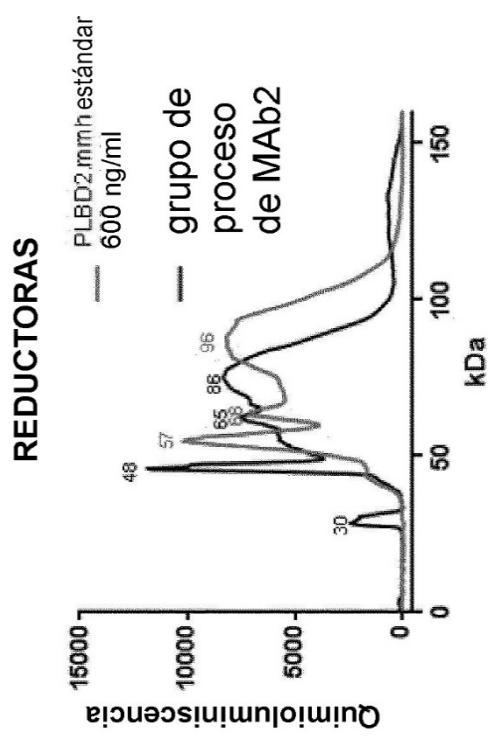


FIG. 5B



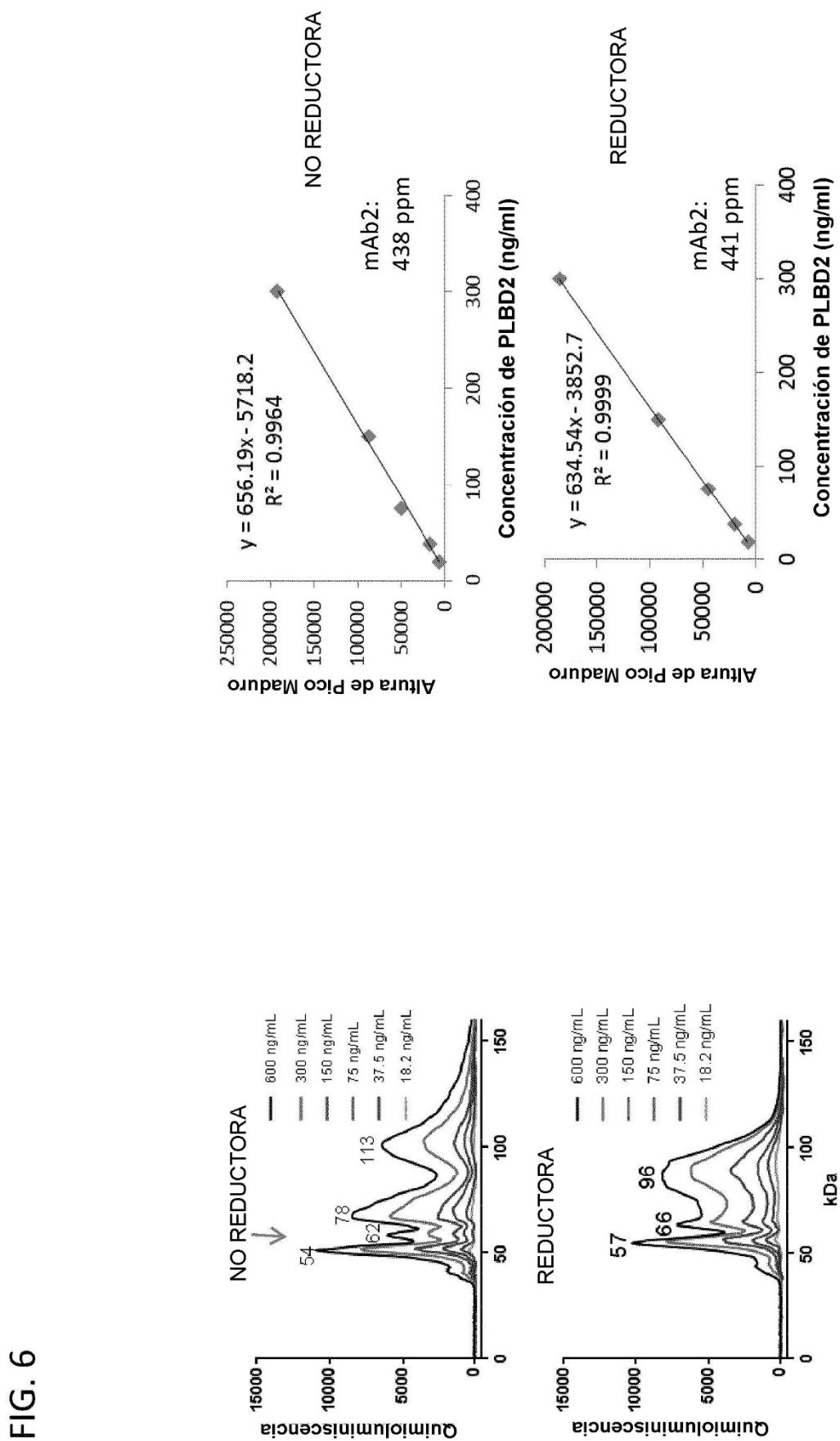


FIG. 7

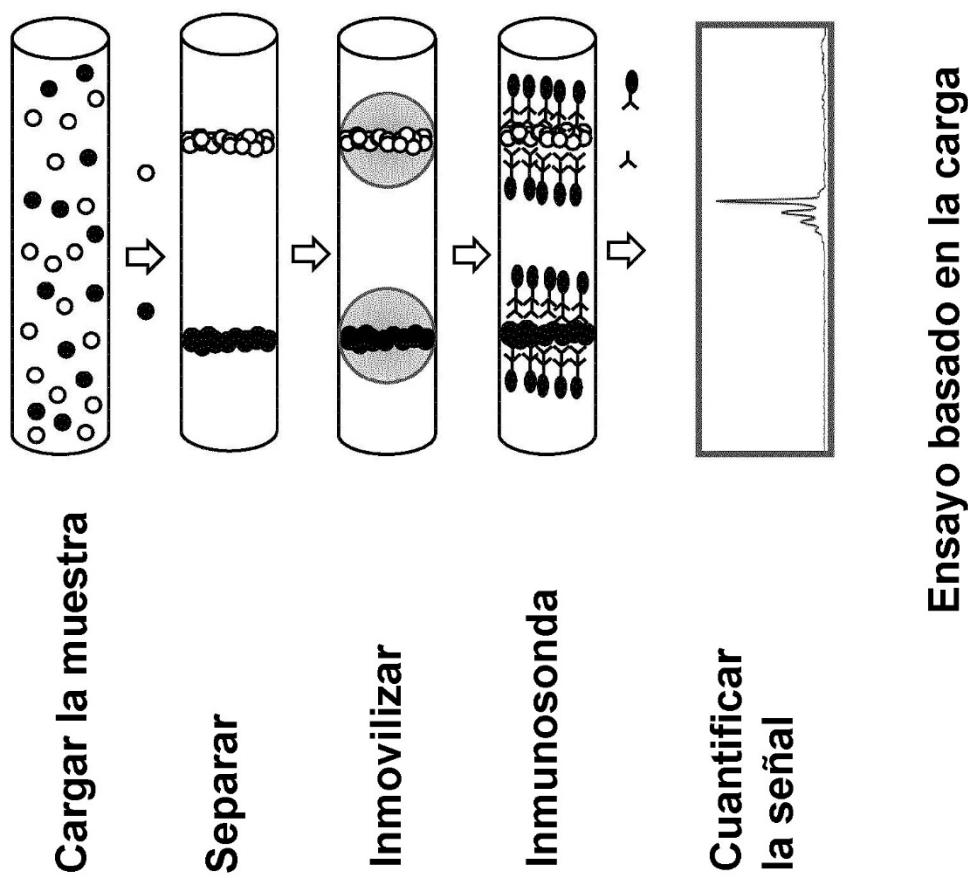


FIG. 8
iCIEF

CE-WESTERN

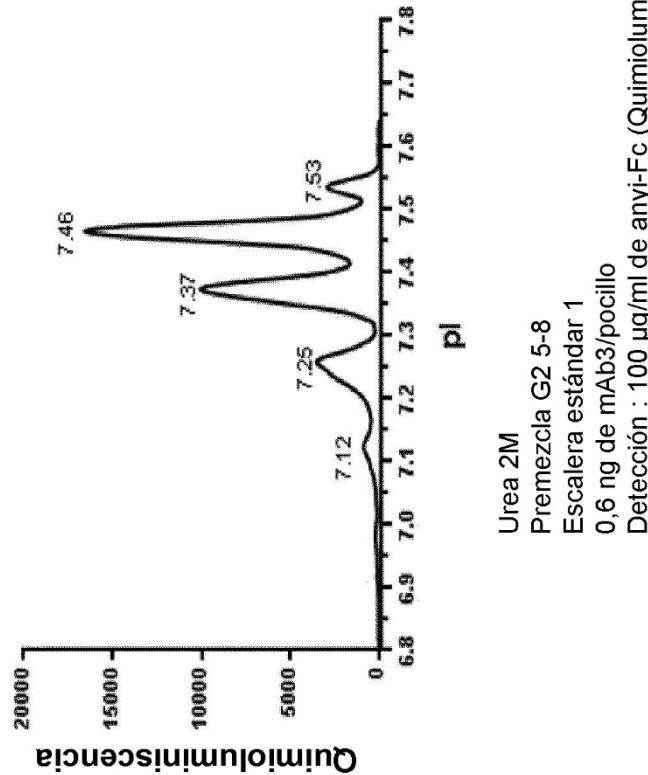
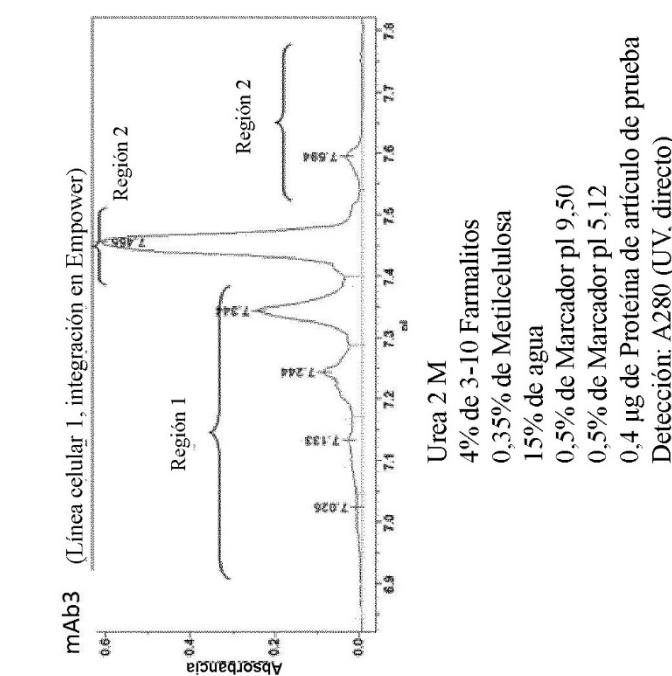


FIG. 9A

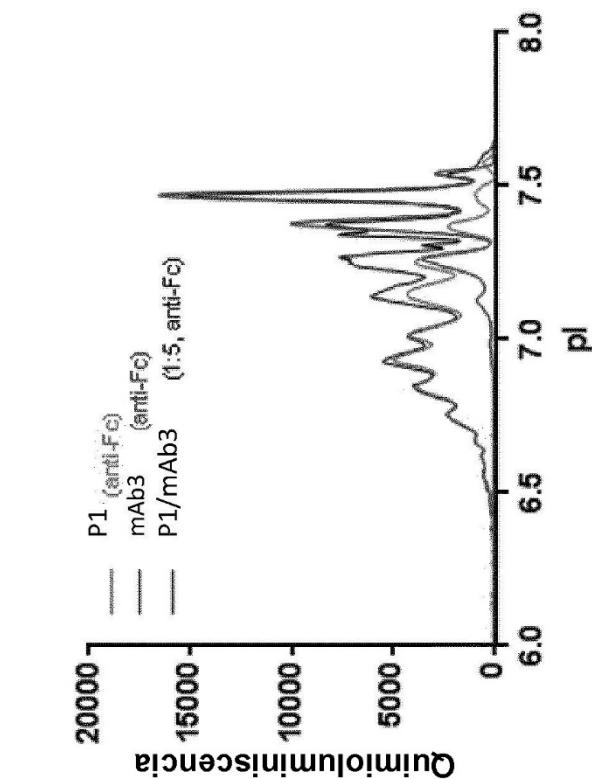
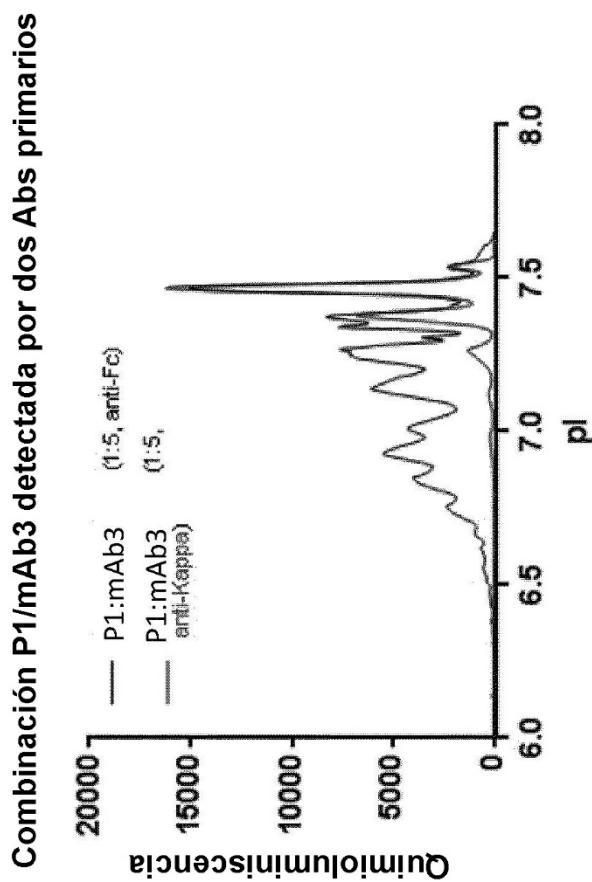


FIG. 9B



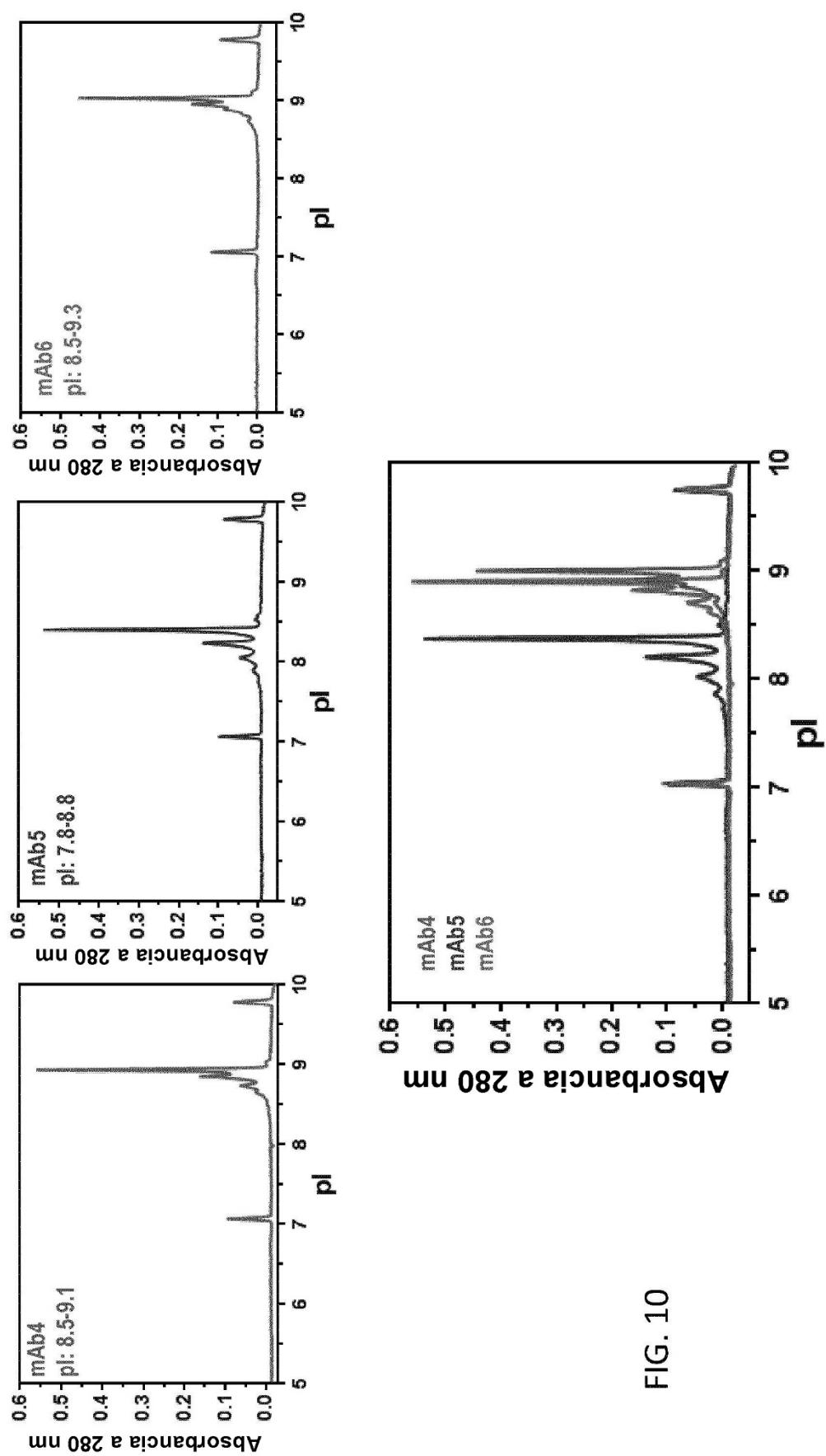
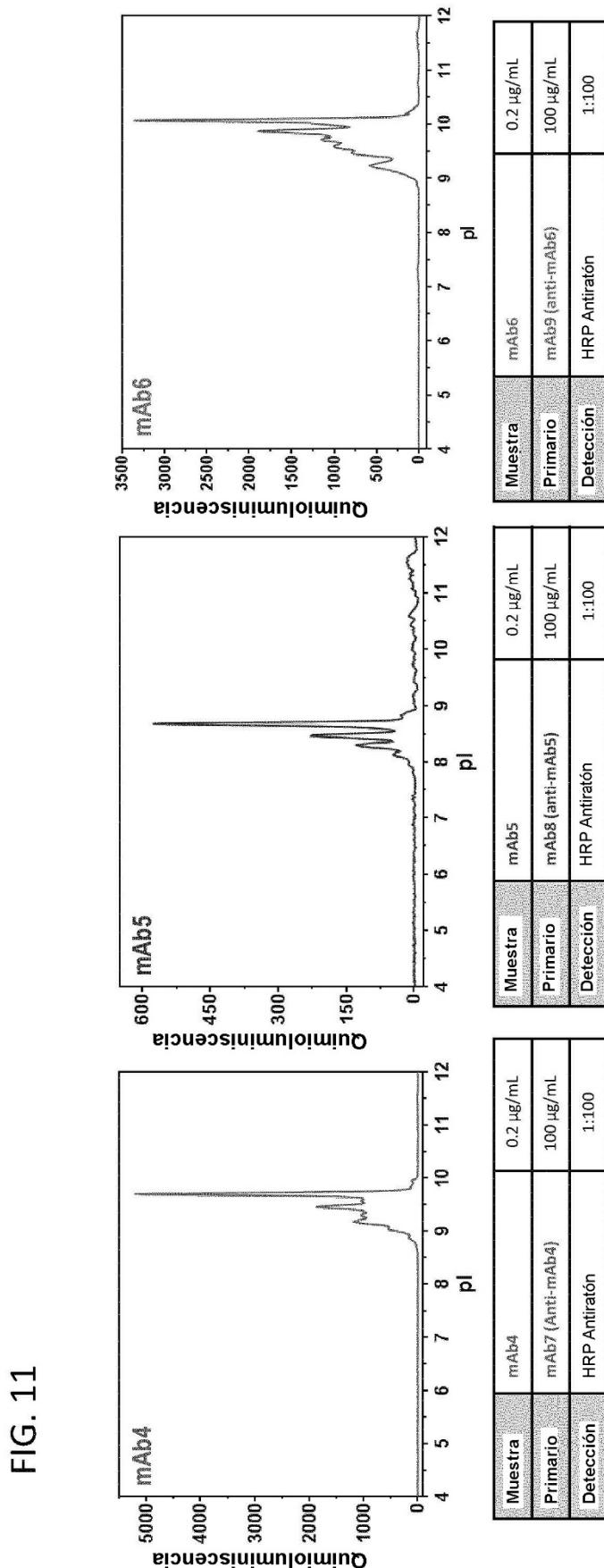


FIG. 10



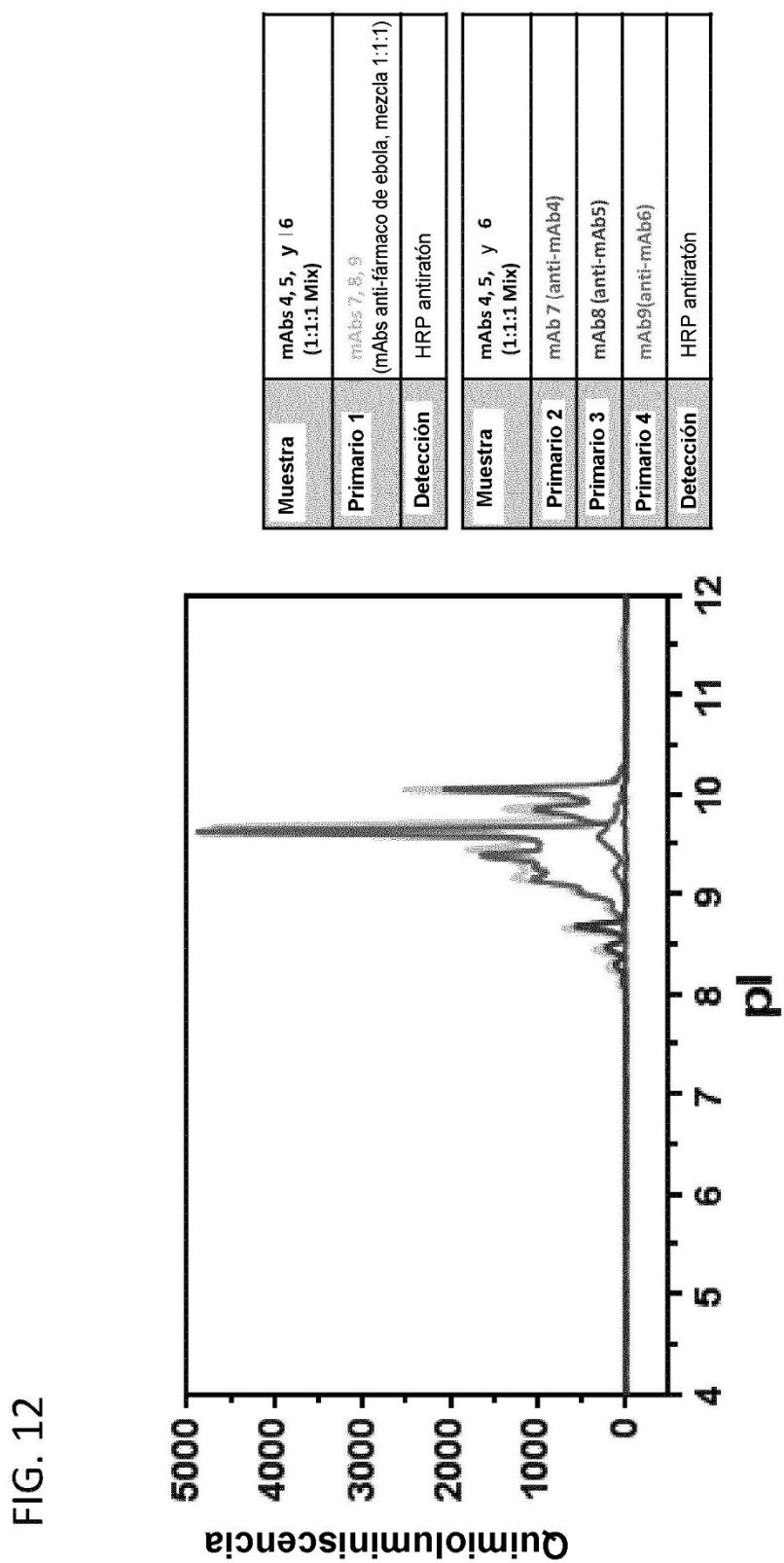


FIG. 13

