

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 064**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2019 PCT/US2019/021927**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2019 WO19178151**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2019 E 19717387 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2023 EP 3765856**

54 Título: **Métodos para la preparación de polipéptidos resistentes a tripsina para análisis espectrométrico de masas**

30 Prioridad:

13.03.2018 US 201862642444 P

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

10.04.2024

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**BENCHAAR, SABRINA AMELLE y
DYKSTRA, ANDREW**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 965 064 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

Métodos para la preparación de polipéptidos resistentes a tripsina para análisis espectrométrico de masas

5 CAMPO

La materia en cuestión presentada se refiere al campo de análisis de polipéptidos. Específicamente, la materia en cuestión presentada se refiere a la preparación de muestras para la detección de polipéptidos comprendidos en las mismas, tales como polipéptidos terapéuticos. Los métodos divulgados usan digestión secuencial en la preparación de los polipéptidos, en donde una última digestión comprende el uso de la elastasa de neutrófilos.

ANTECEDENTES

El método multiatributo (MAM) depende de la digestión enzimática de moléculas seguida de caracterización basada en espectrometría de masas y cuantificación de atributos de interés. Las modificaciones en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son de particular preocupación porque pueden influir en la potencia y/o seguridad de la molécula. La tripsina, que escinde el extremo C de residuos de lisina y arginina, se utiliza típicamente como la enzima de elección para el cartografiado peptídico y MAM por muchas razones, incluyendo la alta especificidad de digestión y la frecuencia de aparición de residuos de lisina y arginina; la digestión con tripsina produce péptidos con residuos básicos en el extremo C, que también tienen típicamente una longitud óptima para análisis basado en espectrometría de masas. Sin embargo, muchas de las moléculas de acoplador de linfocitos T biespecífico (BiTE[®]) que actualmente se están desarrollando en Amgen contienen un dominio α -CD3 conservado con dos CDR en cercana proximidad a una región conectora larga. Una de estas CDR (HGNFGNSYISYWAY) contiene dos residuos de asparagina que pueden ser susceptibles a desamidación y un residuo de triptófano que puede ser susceptible a oxidación. Esta región de la molécula no contiene residuos susceptibles a digestión con tripsina (**figura 1**). Por tanto, los atributos de interés en los dominios CDR no pueden supervisarse por MAM debido al gran tamaño de este péptido (~8 kDa), la dificultad en separar cromatográficamente versiones modificadas del péptido, la poca recuperación y/o ionización del péptido, y los retos generales asociados con interpretar los datos de espectrometría de masas correspondientes a péptidos de este tamaño. Además, esta región conectora no tiene residuos susceptibles a proteasas secundarias usadas comúnmente tales como Asp-N, Lys-C y Glu-C. Aunque la quimotripsina escinde en residuos de triptófano, no se persiguió la utilización de esta enzima a causa de la baja especificidad de la enzima y también porque la oxidación en residuos de triptófano puede afectar a la cuantificación de este atributo. Asimismo, muchas moléculas BiTE[®] también tienen un péptido conector más corto (~5-7 kDa) en cercana proximidad a CDR específicas de diana lo que es asimismo difícil de supervisar con digestión con tripsina. Por ejemplo, un posible sitio de isomerización de ácido aspártico de CDR está localizado dentro del péptido conector de 5,7 kDa. Colectivamente, estos atributos pueden influir en la unión de la diana y/o CD3, que necesita supervisión basada en MAM.

C. A. Hobbs *et al.*, "Identification of the SPLUNC1 ENaCt-inhibitory domain yields novel strategies to treat sodium hyperabsorption in cystic fibrosis airway epithelial cultures", *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol.*, 2013, vol. 305 (12), páginas 990-1001, se refiere a la identificación del dominio inhibidor del polipéptido del clon 1 corto epitelial del paladar, pulmonar y nasal (SPLUNC1), que es una proteína secretada de defensa innata y un inhibidor autocrino del canal de sodio epitelial (ENaC), que es responsable de la absorción de Na⁺ y fluidos a través de los epitelios del colon, el riñón y las vías respiratorias.

X. Guo *et al.*, "Confetti: A Multiprotease Map of the HeLa Proteome for Comprehensive Proteomics*", *Mol. Cell Proteomics*, 2014, páginas 1573-1584, aspira a mejorar la cobertura de la secuencia proteínica y a abordar regiones de proteínas que no generan péptidos tripticos útiles por digestión multienzimática.

SUMARIO

En un primer aspecto, en este documento se proporcionan métodos de preparación de un polipéptido para análisis, que comprende escindir el polipéptido en una muestra en una primera digestión, en donde la escisión produce al menos dos fragmentos del polipéptido, escindir los al menos dos fragmentos del polipéptido con elastasa de neutrófilos; y analizar la muestra después de escindir los al menos dos fragmentos del polipéptido con la elastasa de neutrófilos.

En un segundo aspecto, en este documento se proporcionan métodos de preparación de un polipéptido para análisis, que comprende escindir el polipéptido en una muestra en una primera digestión, en donde la escisión produce al menos dos fragmentos del polipéptido; dividir la muestra que comprende los al menos dos fragmentos en una primera alícuota y una segunda alícuota; digerir los al menos dos fragmentos de la primera alícuota con elastasa de neutrófilos; y analizar la primera alícuota y la segunda alícuota. En algunos subaspectos, después de digerir los al menos dos fragmentos polipeptídicos con la elastasa de neutrófilos, se combinan la primera y segunda alícuota.

Tanto en el primero como en el segundo aspecto, la escisión del polipéptido en la primera digestión comprende escisión proteolítica o química. En esos subaspectos, la escisión es preferiblemente escisión proteolítica conseguida por una proteasa, en donde la proteasa tiene una actividad diferente de la elastasa de neutrófilos, opcionalmente en donde la proteasa se selecciona del grupo que consiste en tripsina, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Arg-C,

pepsina, quimotripsina, quimotripsina B, Lys-N proteasa, Lys-C proteasa, Glu-C proteasa, Asp-N proteasa, pancreatopeptidasa, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, proteinasa K y termolisina, y combinaciones de las mismas. En algunos subaspectos de estos primer y segundo aspectos, la proteasa se selecciona del grupo que consiste en tripsina, Asp-N proteasa y Glu-C proteasa, y combinaciones de los mismos; preferiblemente, la proteasa es tripsina. Sin embargo, cuando se usa escisión química para fragmentar el polipéptido en la muestra en estos primer y segundo aspectos, dicha escisión se consigue mediante un compuesto químico, tal como un compuesto químico seleccionado del grupo que consiste en bromuro de cianógeno, 2-nitro-5-tiocianobenzoato, hidroxilamina y BNPS-escatol, y combinaciones de los mismos.

Tanto en el primer como en el segundo aspecto, la muestra puede aplicarse además a un filtro que tiene un punto de corte de peso molecular antes de dicha primera digestión, en donde dicha primera digestión digiere la muestra en el filtro.

Además, el polipéptido puede desnaturalizarse y/o alquilarse, desnaturalizarse y reducirse, o desnaturalizarse, reducirse y alquilarse antes de escindir el polipéptido en la muestra en la primera digestión. La elastasa de neutrófilos es preferiblemente elastasa de neutrófilos humana (EC 3.4.21.37). Cuando se analiza la muestra, el análisis puede incluir al menos una técnica seleccionada del grupo que consiste en cromatografía, electroforesis o espectrometría, y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, cuando la técnica para analizar la muestra comprende cromatografía, la técnica cromatográfica puede seleccionarse del grupo que consiste en cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de ultrarrendimiento, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de adsorción en lecho expandido, cromatografía en fase inversa, cromatografía de interacción hidrófoba y combinaciones de las mismas; cuando la técnica es electroforesis, la técnica electroforética puede seleccionarse del grupo que consiste en electroforesis en gel, electroforesis de flujo libre, electroenfoque, isotacoforesis, electroforesis de afinidad, inmunolectroforesis, contraelectroforesis y electroforesis capilar, electroforesis de zona capilar, y combinaciones de las mismas; y cuando la técnica es espectroscópica (o espectrométrica), la técnica espectroscópica (o espectrométrica) puede seleccionarse del grupo que consiste en espectrometría de masas, espectroscopia ultravioleta, espectroscopia de luz visible, espectroscopia fluorescente y espectroscopia de luz ultravioleta-visible, y combinaciones de las mismas. En algunos subaspectos particulares, la técnica comprende cromatografía de líquidos-espectrometría de masas; en otros casos, la técnica comprende electroforesis de zona capilar acoplada a espectrometría de masas.

Se divulgan además en este documento métodos de preparación de un polipéptido para análisis, que comprenden desnaturalizar, reducir y alquilar el polipéptido; digerir el polipéptido con tripsina para producir fragmentos polipeptídicos escindidos con tripsina; dividir los fragmentos polipeptídicos escindidos con tripsina en una primera alícuota y una segunda alícuota; digerir los fragmentos polipeptídicos escindidos con tripsina de la primera alícuota con elastasa de neutrófilos la primera alícuota y la segunda alícuota a aproximadamente una relación de 1:1; y analizar la alícuotas combinadas. La elastasa de neutrófilos puede ser, por ejemplo, elastasa de neutrófilos humana (EC 3.4.21.37). Cuando se analiza la muestra, el análisis puede incluir al menos una técnica seleccionada del grupo que consiste en cromatografía, electroforesis, espectroscopia, espectrometría y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, cuando la técnica para analizar la muestra comprende cromatografía, la técnica cromatográfica puede seleccionarse del grupo que consiste en cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de ultrarrendimiento, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de adsorción en lecho expandido, cromatografía en fase inversa, cromatografía de interacción hidrófoba y combinaciones de las mismas; cuando la técnica es electroforesis, la técnica electroforética puede seleccionarse del grupo que consiste en electroforesis en gel, electroforesis de flujo libre, electroenfoque, isotacoforesis, electroforesis de afinidad, inmunolectroforesis, contraelectroforesis y electroforesis capilar, electroforesis de zona capilar, y combinaciones de las mismas; y cuando la técnica es espectrometría, la técnica espectroscópica (o espectrométrica) puede seleccionarse del grupo que consiste en espectrometría de masas, espectroscopia ultravioleta, espectroscopia de luz visible, espectroscopia fluorescente y espectroscopia de luz ultravioleta-visible, y combinaciones de las mismas. En algunos subaspectos particulares, la técnica comprende cromatografía de líquidos-espectrometría de masas; en otros casos, la técnica comprende electroforesis de zona capilar acoplada a espectrometría de masas.

Se divulgan además en este documento métodos de preparación de un polipéptido para análisis, que comprenden proporcionar una muestra que comprende el polipéptido; aplicar la muestra a un filtro que tiene un punto de corte de peso molecular; digerir la muestra en el filtro con una primera proteasa; digerir la muestra en el filtro con una segunda proteasa; y analizar la muestra, en donde la segunda proteasa es elastasa de neutrófilos; y la primera proteasa es diferente de la segunda proteasa. Por ejemplo, la primera proteasa puede comprender una proteasa seleccionada del grupo que consiste en tripsina, Asp-N y Glu-C; además, el polipéptido puede desnaturalizarse y/o reducirse y/o alquilarse antes de digerir el polipéptido con la primera proteasa. La elastasa de neutrófilos puede ser, por ejemplo, elastasa de neutrófilos humana (EC 3.4.21.37). Cuando se analiza la muestra, el análisis puede incluir al menos una técnica seleccionada del grupo que consiste en cromatografía, electroforesis, espectroscopia, espectrometría y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, cuando la técnica para analizar la muestra comprende cromatografía, la técnica cromatográfica puede seleccionarse del grupo que consiste en cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de ultrarrendimiento, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de adsorción en lecho

expandido, cromatografía en fase inversa, cromatografía de interacción hidrófoba y combinaciones de las mismas; cuando la técnica es electroforesis, la técnica electroforética puede seleccionarse del grupo que consiste en electroforesis en gel, electroforesis de flujo libre, electroenfoque, isotacoforesis, electroforesis de afinidad, inmunoelectroforesis, contraelectroforesis y electroforesis capilar, electroforesis de zona capilar, y combinaciones de las mismas; y cuando la técnica es espectroscopia o espectrometría, la técnica espectroscópica (o espectrométrica) puede seleccionarse del grupo que consiste en espectrometría de masas, espectroscopia ultravioleta, espectroscopia de luz visible, espectroscopia fluorescente y espectroscopia de luz ultravioleta-visible, y combinaciones de las mismas. La técnica puede comprender cromatografía de líquidos-espectrometría de masas; en otros casos, la técnica comprende electroforesis de zona capilar acoplada a espectrometría de masas. El filtro puede tener, por ejemplo, un punto de corte de peso molecular de 30 kDa.

Se divulgan además en este documento métodos de preparación de un polipéptido para análisis por cromatografía de líquidos, electroforesis de zona capilar o espectrometría de masas, que comprenden proporcionar una muestra que comprende el polipéptido; aplicar la muestra a un filtro de 30 kDa de PCPM; capturar la muestra en el filtro para producir un retenido; desnaturalizar el retenido de muestra en el filtro; reducir el retenido de muestra en el filtro; alquilar la muestra en el filtro; digerir la muestra en el filtro con una primera proteasa; filtrar la muestra a través del mismo filtro y retener el filtrado; digerir la muestra en el filtro con una segunda proteasa; filtrar la muestra a través del mismo filtro en el filtrado retenido previamente; inactivar las proteasas activas en el filtrado con guanidina; y analizar el filtrado por cromatografía de líquidos, electroforesis de zona capilar o espectrometría de masas; en donde la segunda proteasa es elastasa de neutrófilos; y la primera proteasa es diferente de la segunda proteasa. La elastasa de neutrófilos puede ser elastasa de neutrófilos humana (EC 3.4.21.37).

Los métodos pueden realizarse al menos en parte por automatización. La adición e intercambio de soluciones puede manipularse por un dispositivo o robot automatizado de manipulación de líquidos.

Además, en otro aspecto, los métodos divulgados pueden usarse para preparar y analizar polipéptidos terapéuticos. Los polipéptidos terapéuticos pueden seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y un polipéptido de fusión. Ejemplos de anticuerpos y construcciones de anticuerpo incluyen los seleccionados del grupo que consiste en infliximab, bevacizumab, cetuximab, ranibizumab, palivizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab pegol, ald518, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, anatumomab mafenatox, anrukizumab, apolizumab, arcitumomab, aselizumab, alinumab, atlizumab, atorilimumab, tocilizumab, bapineuzumab, basiliximab, bavituximab, bectumomab, belimumab, benralizumab, bertilimumab, besilesomab, bevacizumab, bezlotoxumab, biciromab, bivatumumab, bivatumumab mertansina, blinatumomab, blosozumab, brentuximab vedotín, briakinumab, brodalumab, canakinumab, cantuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, caplacizumab, capromab pendetide, carlumab, catumaxomab, cc49, cedelizumab, certolizumab pegol, cetuximab, citatuzumab bogatox, cixutumumab, clazakizumab, clenoliximab, clivatuzumab tetraxetán, conatumumab, crenezumab, cr6261, dacetuzumab, daclizumab, dalotuzumab, daratumumab, demcizumab, denosumab, detumomab, dorlimomab aritox, drozitumab, duligotumab, dupilumab, ecromeximab, eculizumab, edobacomab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, elotuzumab, elsilimumab, enavatuzumab, enlimomab pegol, enokizumab, enoticumab, ensituximab, epitumomab cituxetán, epratuzumab, erenumab, erlizumab, ertumaxomab, etaracizumab, etrolizumab, evolocumab, exbivirumab, fanolesomab, faralimumab, farletuzumab, fasinumab, fbta05, felvizumab, fezakinumab, ficlatuzumab, figitumumab, flantovumab, fontolizumab, foralumab, foravirumab, fresolimumab, fulranumab, futuximab, galiximab, ganitumab, gantenerumab, gavilimumab, gemtuzumab ozogamicina, gevokizumab, girentuximab, glembatumumab vedotín, golimumab, gomiliximab, gs6624, ibalizumab, ibritumomab tiuxetán, icrucumab, igovomab, imciromab, imgatuzumab, inclacumab, indatuximab ravtansina, infliximab, intetumumab, inolimumab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, iratumumab, itolizumab, ixekizumab, keliximab, labetuzumab, lebrikizumab, lemalesomab, lerdelimumab, lexatumumab, libivirumab, ligelizumab, lintuzumab, lirilumab, lorvotuzumab mertansina, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, maslimomab, mavrilimumab, matuzumab, mepolizumab, metilimumab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, mogamulizumab, morolimumab, motavizumab, moxetumomab pasudotox, muromonab-cd3, nacolomab tafenatox, namilumab, naptumomab estafenatox, narnatumab, natalizumab, nebacomab, necitumumab, nerelimumab, nesvacumab, nimotuzumab, nivolumab, nofetumomab merpentán, ocaratuzumab, ocrelizumab, odulimumab, ofatumumab, olaratumab, olokizumab, omalizumab, onartuzumab, oportuzumab monatox, oregovomab, orticumab, otelixizumab, oxelumab, ozanezumab, ozoralizumab, pagibaximab, palivizumab, panitumumab, panobacomab, parsatuzumab, pascolizumab, pateclizumab, patritumab, pentumomab, perakizumab, pertuzumab, pexelizumab, pidilizumab, pintumomab, placulumab, ponzumab, priliximab, primumab, PRO 140, quilizumab, racotumomab, radretumab, rafivirumab, ramucirumab, ranibizumab, raxibacomab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, roledumab, romosozumab, rontalizumab, rovelizumab, ruplizumab, samalizumab, sarilumab, satumomab pendetide, secukinumab, sevirumab, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, simtuzumab, sipilizumab, sirukumab, solanezumab, solitomab, sonepcizumab, sontuzumab, stamulumab, sulesomab, suvizumab, tabalumab, tacatuzumab tetraxetán, tadocizumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab paptox, tefibazumab, telimumab aritox, tenatumomab, tefibazumab, teneliximab, teplizumab, teprotumumab, tezepelumab, TGN1412, tremelimumab, ticilimumab, tildrakizumab, tigatuzumab, TNX-650, tocilizumab, toralizumab, tositumomab, tralokinumab, trastuzumab, TRBS07, tregalizumab, tucotuzumab celmoleucina, tuvirumab, ublituximab, urelumab, urtoxazumab, ustekinumab, vopaliximab, vatelizumab, vedolizumab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimumab, vesencumab, visilizumab, volociximab, vorsetuzumab mafodotín, votumumab, zalutumumab, zanolimumab, zatuximab, ziralimumab,

zolimomab aritox, y esos anticuerpos mostrados en la tabla H. En otros subaspectos más, el polipéptido terapéutico es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una glucoproteína, polipéptido CD, un polipéptido del receptor HER, un polipéptido de adhesión celular, un polipéptido de factor de crecimiento, un polipéptido de insulina, un polipéptido relacionado con insulina, un polipéptido de coagulación, un polipéptido relacionado con la coagulación, albúmina, IgE, un antígeno de grupo sanguíneo, un factor estimulante de colonias, un receptor, un factor neurotrófico, un interferón, una interleucina, un antígeno vírico, una lipoproteína, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensoactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa y -beta, encefalinasa, péptido asociado a gonadotropina de ratón, DNasa, inhibina, activina, una integrina, proteína A, proteína D, un factor reumatoide, una inmunotoxina, una proteína morfogenética ósea, una superóxido dismutasa, un polipéptido de membrana superficial, un factor acelerante de descomposición, una envoltura del virus del SIDA, un polipéptido de transporte, un receptor de migración dirigida, una adhesina, un polipéptido regulador, una inmunoadhesina, una miostatina, un polipéptido TALL, un polipéptido amiloide, una linfopoyetina estromal tímica, un ligando de RANK, un polipéptido c-kit, un receptor de TNF y una angiopoyetina, y fragmentos biológicamente activos, análogos o variantes de los mismos.

En algunos casos, el polipéptido terapéutico es un BiTE[®] (acoplador de linfocitos T biespecífico).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra un dominio α -CD3 conservado entre muchas moléculas BiTE[®] (canónicas y con prolongación de la semivida). La digestión trípica produce un péptido de 8 kDa que contiene dos regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con múltiples puntos calientes.

La **figura 2** muestra la especificidad enzimática para la elastasa de neutrófilos humana. P1 corresponde al extremo C de un aminoácido, y P1' corresponde al extremo N del posterior residuo. El tamaño de fuente relativo corresponde a la probabilidad de escisión en este residuo particular (adaptado de la base de datos MEROPS; (Rawlings *et al.*, 2014))

La **figura 3** muestra cromatogramas de iones extraídos (EIC) de muestras de BiTE[®]-1 sin sobrecargar y con desamidación forzada (pH 8,5, 50 °C, t=3 d), que muestran especies sin modificar y desamidadas después de desamidación forzada.

La **figura 4** muestra espectrometría de masas en tándem (MSMS) de las tres especies desamidadas observadas en la figura 3. El ion b3 diagnóstico está desplazado en +0,9838 Da en el pico tres con respecto a los picos 1 y 2. Este desplazamiento de masa corresponde a desamidación.

La **figura 5** muestra un esquema que resalta las diferencias entre el MAM convencional de una sola digestión y una estrategia de MAM para moléculas BiTE[®], que incorpora mezclar 1:1 la muestra digerida con tripsina y la muestra digerida con tripsina seguida de digestión con elastasa de neutrófilos.

La **figura 6** muestra el diseño experimental usado para evaluar la eficacia y robustez del protocolo 3 (véanse los *ejemplos*, a continuación, para más detalles).

La **figura 7** muestra un esquema de preparación de sobremuestra resumida en el protocolo 4 (véanse los *ejemplos*, a continuación, para más detalles).

La **figura 8** muestra la especificidad de tripsina del protocolo 4 para BiTE[®]-1, BiTE[®]-2 y BiTE[®]-3. La especificidad se calculó con MassAnalyzer inicialmente por escisión estricta con tripsina determinante en parámetros de búsqueda. Entonces los datos se investigaron con escisión en el extremo C de residuos KRVITAL (baja especificidad). La especificidad de tripsina fue el área total de los péptidos identificados con la búsqueda estricta con tripsina dividida por el área total de los péptidos identificados con la búsqueda de escisión de KRVITAL. Este valor se expresó como un porcentaje.

La **figura 9** muestra el porcentaje de área total correspondiente al péptido conector de 8 kDa para BiTE[®]-1, BiTE[®]-2 y BiTE[®]-3. Los datos se buscaron con MassAnalyzer con escisión en el extremo C de residuos KRVITAL (baja especificidad). El área total de péptidos correspondiente al péptido conector de 8 kDa se dividió por el área total de todos los péptidos identificados con la búsqueda de escisión de KRVITAL. Este valor se expresó como un porcentaje. El porcentaje de área total correspondiente al péptido conector de 8 kDa es mayor para BiTE[®]-2 porque como molécula BiTE[®] canónica, no contiene el dominio Fc añadido para la prolongación de la semivida.

La **figura 10** muestra superposiciones de cromatograma de iones totales (TIC) de inyecciones replicadas de muestras de BiTE[®]-3 preparadas con el protocolo 3. Las inyecciones fueron del mismo vial y estuvieron separadas por ~4 d.

La **figura 11** muestra superposiciones de TIC de inyecciones replicadas de muestras de BiTE[®]-3 preparadas con el protocolo 4. Las inyecciones fueron del mismo vial y estuvieron separadas por ~4 d.

La **figura 12** muestra superposiciones de TIC que comparan la muestra BiTE[®]-2 preparada por triplicado con los protocolos 4 y 5. Dos picos (flecha) observados en las tres muestras del protocolo 4 corresponden a alquilación no específica.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para abordar la cuestión de los polipéptidos resistentes a escisión para análisis por MAM, se examinaron los sitios de escisión y la especificidad para varias enzimas disponibles en el mercado. La elastasa de neutrófilos humana (HNE; EC 3.4.21.37, también conocida como elastasa-2, elastasa de leucocitos humanos (HLE), serina proteasa de médula ósea, medulasina y elastasa PMN) se ha informado que escinde en el extremo C de residuos de valina, isoleucina, treonina, alanina y leucina (figura 2; (Doucet y Overall, 2011; Rawlings *et al.*, 2014)); sin embargo, la enzima también escinde no específicamente, un perjuicio cuya frecuencia disminuye según disminuye la longitud del sustrato (Stein *et al.*, 1987). Dada una secuencia de aminoácidos de un polipéptido diana, la digestión con HNE puede servir como medio para supervisar regiones deseadas en el polipéptido de no ser por la propensión de HNE a escindir no específicamente los polipéptidos.

Por ejemplo, los autores de la invención observaron que, cuando se digerían moléculas de acoplador de linfocitos T biespecífico (BiTE[®]) solamente con HNE, los péptidos resultantes eran muy numerosos (debido a escisión no específica) y de baja abundancia. Por ejemplo, la figura 1 muestra un dominio α -CD3 conservado entre muchas moléculas BiTE[®] (canónicas y con prolongación de la semividua). La digestión triptica produce un péptido de 8 kDa que contiene dos regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con múltiples puntos calientes que son difíciles de identificar y caracterizar usando experimentos convencionales basados en espectrometría de masas (MS). Este péptido también carece de residuos susceptibles a escisión por otras enzimas de amplio uso tales como Glu-C y Asp-N.

Los autores de la invención observaron inesperadamente que, después de digestión con tripsina sobre filtro, tanto el péptido conector de 8 kDa conservado como los péptidos conectores específicos de molécula de moléculas BiTE[®] se retenían por los filtros con punto de corte de peso molecular (PCPM) de 30 kDa independientemente de si las membranas de filtro estaban compuestas de celulosa regenerada o polietersulfona. Potenciar la especificidad de HNE al digerir en primer lugar con una primera proteasa que no es HNE y explotar la retención imprevista de los péptidos conectores resultantes de la digestión con la primera proteasa mediante filtros de 30 kDa de PCPM (u otro punto de corte) permitió el desarrollo de un método robusto y novedoso para la caracterización de moléculas BiTE[®] (y otros polipéptidos) y la cuantificación de atributos cruciales.

Se divulga una descripción de un método novedoso de preparación de muestra que usa una primera etapa de digestión seguida de digestión con HNE.

Definiciones

Tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicativas únicamente y no son restrictivas. El uso del singular incluye el plural salvo que se indique específicamente de otro modo. El uso de "o" significa "y/o" salvo que se indique de otro modo. El uso de la expresión "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido," no es limitante. Términos tales como "elemento" o "componente" abarca tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad salvo que se indique específicamente de otro modo. El uso del término "porción" puede incluir parte de un resto o el resto completo. Cuando se menciona un intervalo numérico, por ejemplo, 1-5, todos los valores intermedios se incluyen explícitamente, tal como 1, 2, 3, 4 y 5, así como fracciones de los mismos, tales como 1,5, 2,2, 3,4 y 4,1.

"Aproximadamente" o "~" significa, cuando está modificando una cantidad (por ejemplo, "aproximadamente" 3 mM), que puede producirse una variación alrededor de la cantidad modificada. Estas variaciones pueden producirse por una diversidad de medios, tales como procedimientos típicos de medición y manipulación, errores inadvertidos, pureza de los ingredientes y similares.

Se pretende que "que comprende" y "comprende" signifiquen que los métodos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros elementos no enumerados. Las expresiones "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en", cuando se usan en los métodos divulgados, incluyen los elementos enumerados, excluyen los elementos no enumerados que alteran la naturaleza básica del método, pero no excluyen otros elementos no enumerados. Las expresiones "que consiste en" y "consiste en", cuando se usan para definir métodos, excluyen etapas sustanciales del método. Realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta divulgación.

"Acoplado" significa asociado directamente, así como indirectamente. Por ejemplo, un dispositivo o proceso puede estar asociado directamente con otro dispositivo o proceso, o estos dispositivos y/o procesos pueden estar asociados indirectamente entre sí, por ejemplo, mediante otro dispositivo o proceso.

65

"Proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente para indicar una cadena de aminoácidos, en donde cada aminoácido está conectado al siguiente mediante un enlace peptídico.

5 "Desnaturalización", "desnaturalizante", "desnaturalizar" y similares significan un proceso en que los polipéptidos pierden al menos parcialmente la estructura cuaternaria, la estructura terciaria y la estructura secundaria que se encuentran en los polipéptidos en sus estados naturales al aplicar una agresión externa o reactivo (es decir, un desnaturalizante).

10 "Desnaturalizante" significa cualquier sustancia, composición, energía o condición que puede desnaturalizar un polipéptido. Ejemplos de desnaturalizantes incluyen un ácido o base fuerte, una sal inorgánica, un disolvente orgánico, radiación, un agente caótopo o calor, o combinaciones de estos.

15 "Polipéptido desnaturalizado", "proteína desnaturalizada" y similares significan un polipéptido que tiene su estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria cambiada respecto al polipéptido natural. Un polipéptido puede desnaturalizarse completamente o desnaturalizarse parcialmente. Un "polipéptido no desnaturalizado" o "proteína no desnaturalizada" (y expresiones similares) significa un polipéptido que ha mantenido su estructura secundaria, terciaria y, según lo aplicable, cuaternaria. Un "polipéptido natural" o "proteína natural" (y similares) se refiere a un polipéptido como se encuentra en la naturaleza y tiene cualquier secuencia de referencia primaria descrita en la base de datos UniProt Knowledgebase (The UniProt, 2017) o la base de datos UniGene (Pontius *et al.*, 2003).

20 "Polipéptido reducido" o "proteína reducida" (y expresiones similares) significa un polipéptido en que al menos uno de sus enlaces disulfuro intercatenarios o intracatenarios está roto. Dichos enlaces se pueden formar entre grupos tiol reducidos, tales como los disponibles en residuos de cisteína.

25 "Polipéptido alquilado" o "proteína alquilada" (y similares) significa un polipéptido al que se ha transferido un grupo alquilo. De forma pragmática, los polipéptidos a menudo se alquilan en grupos tiol (tales como los disponibles en residuos de cisteína) para evitar que los tioles reducidos formen, o vuelvan a formar después de la reducción, enlaces o puentes disulfuro.

30 "Digestión" y similares, en el contexto de polipéptidos, significa la fragmentación de un polipéptido en dos o más fragmentos, estando dicha fragmentación mediada por otra sustancia, compuesto químico o enzima.

35 "Escisión proteolítica", "digestión proteolítica" y similares significa la escisión de un polipéptido al romper los enlaces peptídicos en un polipéptido, produciendo, por tanto, fragmentos. La escisión proteolítica puede estar mediada por enzimas.

40 "Proteasa", "peptidasa", "enzima de escisión proteolítica", "endoproteinasa", "proteínasa" y similares significan una enzima y significan un polipéptido o fragmento del mismo que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos. Las proteasas incluyen variantes de una secuencia de aminoácidos de proteasas conocidas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos, incluso en donde dicha actividad catalizante se reduce en la variante.

45 Las reacciones catalizadas por enzima se clasifican de acuerdo con el sistema de numeración de la Comisión de Enzimas. Como las proteasas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos, se clasifican en clase EC 3.4, que incluye, aminopeptidasas EC 3.4.11, dipeptidasas EC 3.4.13, dipeptidil peptidasas y tripeptidil peptidasas EC 3.4.14, peptidil dipeptidasas EC 3.4.15, carboxipeptidasas de tipo serina EC 3.4.16, metalocarboxipeptidasas EC 3.4.17, carboxipeptidasas de tipo cisteína EC 3.4.18, omega peptidasas EC 3.4.19, EC 3.4.21: serina proteasas, cisteína proteasas EC 3.4.22, endopeptidasas aspárticas EC 3.4.23, EC 3.4.24: metalopeptidasas, treonina endopeptidasas EC 3.4.25, endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido EC 3.4.99. Ejemplos específicos de proteasas incluyen tripsina (EC 3.4.21.4), endoproteinasa Asp-N (EC 3.4.24.33) y endoproteínasa Glu-C (EC 3.4.21.19).

50 Las elastasas son proteasas que (excepto por las clasificadas como EC 3.4.21.70) hidrolizan la elastina, un polipéptido de fibra elástica de la matriz extracelular. Hay ocho genes humanos que codifican elastasas (tabla A):

Tabla A

Las elastasas humanas				
Familia	Gen	Nombre	Número EC	Escisión preferente
Neutrófilos				
Quimotripsina	ELANE (ELA2)	Elastasa de neutrófilos (elastasa 2)	3.4.21.37	Val- -Xaa; Ala- -Xaa; Thr- -Xaa; Ile- -Xaa; Leu- -Xaa
	CTRC (ELA4)	Quimotripsina C (cadlecrina) (elastasa 4)	3.4.21.2	Leu- -Xaa; Tyr- -Xaa; Phe- -Xaa; Met-1-Xaa; Trp- -Xaa; Gin-1-Xaa; Asn- -Xaa
Similar a quimotripsina				
	CELA1 (ELA1)	Familia de elastasas similares a quimotripsina, miembro 1 (elastasa pancreática 1)	3.4.21.36	Ala- -Xaa
	CELA2A (ELA2A)	Familia de elastasas similares a quimotripsina, miembro 2A (elastasa pancreática 2A)	3.4.21.71	Leu- -Xaa Met- -Xaa Phe- -Xaa
	CELA2B (ELA2B)	Familia de elastasas similares a quimotripsina, miembro 2B (elastasa pancreática 2B)	3.4.21.71	Leu- -Xaa Met- -Xaa Phe- -Xaa
	CELA3A (ELA3A)	Familia de elastasas similares a quimotripsina, miembro 3A (elastasa pancreática 3A)	3.4.21.70	Ala- -Xaa (no hidroliza elastina)
	CELA3B (ELA3B)	Familia de elastasas similares a quimotripsina (elastasa pancreática 3B)	miembro 3B 3.4.21.70	Ala- -Xaa (no hidroliza elastina)
Macrófagos				
	MMP12 (HME)	Metaloelastasa de macrófagos (elastasa de macrófagos)	3.4.24.65	Hidrólisis de elastina soluble e insoluble. También se producen escisiones específicas en 14-Ala- -Leu-15 y 16-Tyr- -Leu-17 en la cadena B de insulina

5 La "elastasa de neutrófilos" (a veces denominada elastasa-2, elastasa de leucocitos, serina proteasa de médula ósea, medulasina o PMN elastasa) es una elastasa que los neutrófilos y macrófagos secretan durante la inflamación para destruir las bacterias. La elastasa de neutrófilos humana (HNE) se describió por primera vez en 1968 (Janoff y Scherer, 1968). Se demostró que HNE difiere de las elastasas pancreáticas en que el inhibidor de tripsina de soja y el inhibidor de calicreína de la saliva inhiben HNE, pero no inhiben la actividad de elastasa pancreática. HNE mantiene la actividad a concentraciones salinas fisiológicas, mientras disminuye la actividad de elastasa pancreática. HNE es al menos diez veces más resistente a inhibidor de elastasa sérica (como se define por Janoff y Scherer, 1968) que la elastasa pancreática. Finalmente, HNE es también más resistente a bajo pH que la elastasa pancreática (Janoff y Scherer, 1968).

Sinha *et al.* (Sinha *et al.*, 1987) describieron por primera vez la secuencia de aminoácidos de HNE y mostraron que el polipéptido tenía solamente un 43 % de homología de secuencia con la elastasa pancreática de cerdo. La base de

datos UniProt para UniProtKB - P08246 (ELNE_HUMAN) (The UniProt, 2017) describe ELANE como codificante de HNE como un polipéptido precursor de 267 aminoácidos que consiste en un péptido señal (residuos aminoácidos 1-27), un dominio propeptídico (residuos 28-29) y el polipéptido maduro (residuos 30-267). Dentro del polipéptido maduro reside el dominio peptidasa S1 (residuos 30-247). Pueden encontrarse enlaces disulfuro que se forman entre los residuos 55 y 71, 151 y 208, 181 y 187, y 198-223. Los residuos de asparagina en las posiciones 88, 124 y 174 pueden glucosilarse (ligarse a N). La secuencia para HNE se muestra en la tabla B. En la tabla B, los péptidos señal están **en fuente negrita**, el dominio propeptídico está con un solo subrayado, el polipéptido maduro está *en cursiva*, y el dominio peptidasa S1 está **con doble subrayado, en cursiva y en fuente negrita**.

10 **Tabla B**

Secuencia de aminoácidos de elastasa de neutrófilos humana (HNE) (SEQ ID NO:1)	
MTLGRRLACL <u>FLACVLPALL</u> <u>LGGTALASEI</u> <u>VGRRARPHA</u> <u>WPFMVSLOLR</u> <u>GGHFCGATLI</u>	60
APNFVMSAAH <u>CVANVNVRAV</u> <u>RVVLGAHNLS</u> <u>RREPTRQVFA</u> <u>VQRIFENGYD</u> <u>PVNLNDIVI</u>	120
LQLNGSATIN <u>ANQVAQLPA</u> <u>QGRRLGNGVQ</u> <u>CLAMGWLLG</u> <u>RNRGIASVLO</u> <u>ELNVTVTSL</u>	180
CRRSNVCTLV <u>RGRQAGVCFG</u> <u>DSGSPLVCNG</u> <u>LIHGIAFVR</u> <u>GGCASGLYPD</u> <u>AFAPVAQFVN</u>	240
WIDSIIQRSE <u>DNPCPHPRDP</u> <u>DPASRTH</u>	267

HNE puede hidrolizar casi cualquier miembro polipeptídico de la matriz extracelular, incluyendo varios tipos de colágeno, fibronectina, proteoglicanos, heparina y fibrina reticulada.

15 HNE escinde enlaces peptídicos en que el residuo P1 es un pequeño grupo alquilo. La especificidad de sustrato se resume en la figura 2.

20 "Escisión química" en el contexto de producir fragmentos de un polipéptido, significa la fragmentación del polipéptido por un compuesto químico. Un "compuesto químico" es una sustancia o compuesto no proteínico. Los compuestos químicos pueden ser orgánicos o inorgánicos.

25 El "punto de corte de peso molecular" o "PCPM" significa que el PCPM de una membrana es una representación de la selectividad de la membrana por moléculas de soluto de diferentes pesos moleculares (PM), donde el valor de PM (expresado en dalton (Da)) se obtiene de la molécula de soluto que da un rechazo de un 90 % cuando se filtra una serie de solutos de diferente PM en el disolvente diana (que, para la mayoría de las aplicaciones de membrana accionadas por presión basadas en líquido, es agua), donde el rechazo se define como en la ec. (1):

$$\text{Rechazo, } R(\%) = \left(1 - \frac{C_p}{C_f}\right) \times 100$$

30 donde C_p y C_f son la concentración de permeado y alimentación, respectivamente.

35 El PCPM se determina experimentalmente usando dextrano, polietilenglicol y proteínas de diversos pesos moleculares para clasificar el PCPM de las membranas o filtros. El rechazo depende de muchos parámetros del soluto y el proceso como el tipo de soluto, la concentración, hidrodinámica, presión, temperatura y pH. Las mediciones de PCPM habitualmente se realizan en experimentos separados usando diferentes solutos, cada uno con un determinado PM.

40 Para PM de bajo intervalo (aproximadamente por debajo de 10 kDa), pueden usarse polietilenglicoles (PEG), n-alcános y oligoestirenos en ensayos de rechazo de soluto. Para PM de alto intervalo (aproximadamente mayor de 10 kDa), a menudo se usan dextranos y glúcidos (Rohani *et al.*, 2011).

Métodos

45 En este documento se divulgan métodos dirigidos a digerir un polipéptido en una muestra con una primera proteasa y una segunda proteasa, en donde la primera proteasa produce al menos dos fragmentos del polipéptido, que los al menos dos fragmentos del polipéptido se digieren posteriormente por la segunda proteasa; y analizar la muestra después de digerir con la segunda proteasa, en donde la segunda proteasa es elastasa de neutrófilos; y la primera proteasa es diferente de la segunda proteasa. Otras etapas en el método pueden incluir dividir la muestra en dos alícuotas después de digerir el polipéptido en la muestra con la primera proteasa, y después digerir el polipéptido en una de las dos alícuotas con la segunda proteasa. Estas alícuotas entonces pueden combinarse antes del análisis. El polipéptido en la muestra puede desnaturalizarse y/o reducirse y/o alquilarse antes de digerir con la primera proteasa. El análisis puede incluir cromatografía, electroforesis, espectrometría y combinaciones de los mismos.

55 En algunas realizaciones, los métodos incluyen aplicar la muestra a un filtro que tiene un PCPM antes de digerir el polipéptido en la muestra en el filtro con la primera proteasa, digerir el polipéptido en la muestra con la segunda proteasa y analizar la muestra. Dichas realizaciones pueden incorporar además etapas de filtración. El filtro de PCPM,

en algunas realizaciones, retiene una proporción significativa del polipéptido y fragmentos polipeptídicos, aunque el tamaño de estos polipéptidos o fragmentos polipeptídicos tienen un PM que es significativamente más pequeño que el PCPM del filtro.

5 **Etapas del método**

Desnaturalización polipeptídica

10 En algunas realizaciones, el polipéptido que se prepara y analiza de acuerdo con los métodos divulgados se desnaturaliza.

15 Los polipéptidos pueden desnaturalizarse usando una diversidad de técnicas y desnaturalizantes aceptados en la técnica. En algunas realizaciones, se usan conjuntamente múltiples desnaturalizantes, de forma simultánea o en secuencia. Por ejemplo, los desnaturalizantes de SDS y calor pueden combinarse para desnaturalizar polipéptidos.

20 La desnaturalización proteínica puede realizarse por cualquier medio que altere la estructura cuaternaria, terciaria o secundaria del polipéptido. Por ejemplo, el uso de caótropos, tales como urea, y detergentes desnaturalizantes (por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS)), calor, agentes reductores y agentes que inactivan los grupos reactivos tiol para bloquear la reformación de disulfuro. El pH de las muestras que contienen polipéptido también puede manipularse para fomentar la desnaturalización. Estos componentes a menudo se usan conjuntamente para desplegar eficazmente los polipéptidos.

25 Ejemplos adicionales de caótropos incluyen, además de urea, n-butanol, etanol, cloruro de guanidinio, perclorato de litio, acetato de litio, cloruro de magnesio, fenol, 2-propanol y tiourea. Se prefiere urea en la mayoría de los casos.

30 Los detergentes se clasifican en forma del grupo hidrófilo: aniónico, catiónico, no iónico y zwitteriónico. Los detergentes aniónicos y catiónicos tienen mayor probabilidad de ser desnaturalizantes, cuyos ejemplos incluyen: SDS, colato de sodio, desoxicolato de sodio, glicocolato de sodio, taurocolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio, N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio (aniónico) y bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) y bromuro de trimetil(tetradecil) amonio (TTAB) (catiónico). En algunos casos, un detergente zwitteriónico puede ser útil, ejemplos incluyen amidosulfobetaína-14 (ASB-14), amidosulfobetaína-16 (ASB-16), C7Bz0, CHAPS, CHAPSO, EMPIGEN® BB, sal interna de propanosulfonato de 3-(N,N-dimetiloctilamonio) (SB3-8), sal interna de propanosulfonato de d (decildimetilamonio) (SB3-10), etc. Se prefieren detergentes aniónicos, siendo SDS particularmente preferido.

35 Un desnaturalizante puede ser calor, tal como una elevada temperatura a o mayor de 30 °C (para la mayoría de polipéptidos). Los desnaturalizantes incluyen agitación. En algunas realizaciones, baja salinidad, incluyendo esencial o sustancialmente o nada de sal puede desnaturalizar los polipéptidos.

40 Un desnaturalizante puede ser un disolvente, tal como etanol u otros alcoholes.

La desnaturalización de los polipéptidos se ha estudiado y descrito ampliamente; por ejemplo, véase (Tanford, 1968) para más detalles. Un experto en la materia comprende la manera de desnaturalizar polipéptidos dada la naturaleza del polipéptido y los muchos desnaturalizantes de los que elegir.

45 **Reducción de polipéptidos**

50 Un polipéptido reducido es un polipéptido que se expone a condiciones reductoras suficientes para reducir un residuo reducible en la estructura polipeptídica, tal como una cisteína. So el polipéptido reducido contiene un grupo tiol, o residuo que contiene azufre, entonces el grupo tiol en el polipéptido reducido se reduce. Un polipéptido reducido que comprende un residuo de cisteína tiene el átomo de azufre del residuo de cisteína reducido, lo que puede indicarse como "-SH". Un polipéptido reducido puede ser un polipéptido que contiene enlace disulfuro. Un polipéptido que contiene enlace disulfuro puede llegar a ser un polipéptido reducido por exposición a condiciones reductoras que provocan que uno o más enlaces disulfuro (puentes disulfuro) en el polipéptido que contiene enlace disulfuro se rompan.

55 Un "agente reductor" o "reductor" es un elemento o compuesto que pierde (o dona) un electrón a otra especie química en una reacción química de oxidorreducción. Un agente reductor permite que los grupos disulfuro lleguen a ser reactivos al generar grupos tiol (-SH). Se muestran agentes reductores comunes de polipéptidos en la tabla C.

60

Tabla C

Reactivos reductores	
Producto	Notas (incluyendo nombres alternativos y entradas CAS)
2-Mercaptoetanol	β -mercaptoetanol (BME, 2BME, 2-ME, b-mer, CAS 60-24-2)
2-Mercaptoetilamina-HCl	2-aminoetanotiol (2-MEA-HCl, cisteamina-HCl, CAS 156-57-0), reduce selectivamente los enlaces disulfuro de la región de bisagra del anticuerpo
Ditiotreitól	Ditiotreitól (DTT, CAS 3483-12-3)
TCEP-HCl	Clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, CAS 5961-85-3) es un reductor sin tiol para enlaces disulfuro de polipéptidos

En algunas realizaciones, la desnaturalización y reducción del polipéptido se realizan simultáneamente. En otras realizaciones, la desnaturalización y reducción del polipéptido se realizan en etapas diferenciadas.

5 Un experto en la materia comprende la manera de reducir polipéptidos dada la naturaleza del polipéptido y los reactivos reductores de los que elegir.

Alquilación de un polipéptido comprendido en una muestra

10 "Inactivar los grupos tiol reactivos" significa bloquear los grupos tiol libres en un polipéptido para evitar reacciones indeseadas de intercambio de tiol-disulfuro. Los agentes alquilantes son sustancias que provocan el remplazo de hidrógeno por un grupo alquilo.

15 La alquilación de cisteínas libres, a menudo después de su reducción, evita la formación y reformación de enlaces disulfuro que podrían formarse de lo contrario entre tioles libres de residuos de cisteína. Agentes alquilantes habitualmente usados incluyen n-etilmaleimida (NEM), yodoacetamida (IAA) y ácido yodoacético. Ejemplos de otros agentes alquilantes adecuados incluyen ácido ditiobis(2-nitro)benzoico; acrilamida; 4-vinilpiridina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo y ciclofosfamida; cisplatino; nitrosoureas, tales como carmustina, lomustina y semustina; alquilsulfonatos, tales como busulfán; etileniminas, tales como tiotepa; y triazinas, tales como dacarbazina. El experto en la materia es consciente de los reactivos que pueden usarse para proteger los grupos sulfhidrilo, así como la manera de usar dichos reactivos.

Digestión polipeptídica

25 Los métodos divulgados en este documento comprenden escindir el polipéptido a analizar en una muestra en una primera digestión, en donde la escisión produce al menos dos fragmentos del polipéptido. Puede usarse cualquier método de fragmentación del polipéptido, con la condición de que se produzcan al menos dos fragmentos del polipéptido; además, es indeseable la degradación completa del polipéptido en, por ejemplo, aminoácidos individuales.

30 En dicha etapa de digestión, los medios convenientes de escisión incluyen usar una proteasa (en donde la proteasa no es elastasa de neutrófilos). Puede usarse cualquier proteasa, siempre que dicha proteasa escinda el polipéptido en al menos dos fragmentos. El fundamento que apoya esta primera digestión antes de digerir con una elastasa de neutrófilos es proporcionar fragmentos polipeptídicos a la elastasa de neutrófilos (tal como elastasa de neutrófilos humana), en donde la elastasa de neutrófilos tiene una especificidad aumentada, en comparación con cuando se le presenta el polipéptido intacto.

35 En algunas realizaciones, pueden usarse mezclas de dos o más proteasas. En otras realizaciones, la primera digestión puede incluir múltiples digestiones secuenciales. Por ejemplo, una primera digestión se realiza con una primera proteasa, y después en una reacción posterior, se realiza una segunda digestión con una segunda proteasa (en donde ninguna proteasa es elastasa de neutrófilos). Una segunda (o más) digestión se completa para mejorar la especificidad de la elastasa de neutrófilos usada en la etapa de escisión del polipéptido adicionalmente con la elastasa de neutrófilos.

45 Ejemplos de proteasas útiles (pero en absoluto inclusivos) incluyen tripsina, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Arg-C, pepsina, quimotripsina, quimotripsina B, Lys-N proteasa, Lys-C proteasa, Glu-C proteasa, Asp-N proteasa, pancreatopeptidasa, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, proteinasa K y termolisina. En algunas realizaciones, se usan combinaciones de estas proteasas. En algunas realizaciones, se usa tripsina sola.

50 Estas y otras proteasas, incluyendo su selectividad de enlace peptídico y sus números de E.C., se muestran en la tabla D, que está adaptada de (sin especificar, 2007). Las fuentes mostradas para cada proteasa son ejemplares solamente; muchas de estas proteasas están disponibles en el mercado.

En algunas realizaciones, puede usarse una relación de proteína:proteasa (p/p) de 10:1, 20:1, 25:1, 50:1 o 100:1. En algunas realizaciones, la relación es 20:1. En algunas realizaciones, la elastasa de neutrófilos usada está a una

5 concentración de aproximadamente 100 ng/ml-1 mg/ml, o aproximadamente 100 ng/ml-500 µg/ml, o aproximadamente 100 ng/ml-100 µg/ml, o aproximadamente 1 µg/ml-1 mg/ml, o aproximadamente 1 µg/ml-500 µg/ml, o aproximadamente 1 µg/ml-100 µg/ml, o aproximadamente 10 µg/mg-1 mg/ml, o aproximadamente 10 µg/mg-500 µg/ml, o aproximadamente 10 µg/mg-100 µg/ml. En algunas realizaciones, la etapa de digestión es durante 10 minutos a 48 horas, o de 30 minutos a 48 horas, o de 30 minutos a 24 horas, o de 30 minutos a 16 horas, o de 1 hora a 48 horas, o de 1 hora a 24 horas, o de 1 hora a 16 horas, o de 1 a 8 horas, o de 1 a 6 horas, o de 1 a 4 horas. En algunas realizaciones, la etapa de digestión se incuba a una temperatura entre 20 °C y 45 °C, o entre 20 °C y 40 °C, o entre 22 °C y 40 °C, o entre 25 °C y 37 °C. En algunas realizaciones, la etapa de digestión se incuba a 37 °C. Un experto en la materia puede elegir las condiciones apropiadas (tampones, tiempos de incubación, cantidad de proteasa, volúmenes, etc.), ya que la digestión con proteasa *in vitro* está bien comprendida en la técnica.

10

Tabla D

Proteasas habitualmente usadas para fragmentación de proteínas			
Proteasa ^a	N.º EC	Selectividad de enlace peptídico	N.º de acceso ejemplar ^b
Tripsina (bovina)	3.4.21.4	P ₁ -P ₁ ¹ - (P ₁ = Lys, Arg)	P00760 ^S
Quimotripsina (bovina)	3.4.21.1	P ₁ -P ₁ ¹ -(P ₁ = aromático, P ₁ ¹ = no específico)	P00766 ^S
Endoproteinasa Asp-N (<i>Pseudomonas fragi</i>)	3.4.24.33	P ₁ -Asp-(y -P ₁ -ácido cisteico)	φ
Endoproteinasa Arg-C (glándula submaxilar de ratón)	φ	-Arg-P ₁ -	-
Endoproteinasa Glu-C (V8 proteasa) (<i>Staphylococcus aureus</i>)	3.4.21.19	-Glu-P ₁ ¹ - (y -Asp-P ₁ ¹ -) (2)	P04188 ^S
Endoproteinasa Lys-C (<i>Lysobacter enzymogenes</i>)	3.4.21.50	-Lys-P ₁ ¹ -	S77957 ^P
Pepsina (porcina)	3.4.23.1	P ₁ -P ₁ ¹ - (P ₁ = pref. hidrófobo)	P00791 ^S
Termolisina (<i>Bacillus thermo-proteolyticus</i>)	3.4.24.27	P ₁ -P ₁ ¹ - (P ₁ = Leu, Phe, Ile, Val, Met, Ala)	P00800 ^S
Elastasa (porcina) (no elastasa de neutrófilos)	3.4.21.36	P ₁ -P ₁ ¹ -(P ₁ = sin cargar, no aromático)	P00772 ^S
Papaína (<i>Carica papaya</i>)	3.4.22.2	P ₁ -P ₁ ¹ -(P ₁ = pref. Arg, Lys)	P00784 ^S
Proteinasa K (<i>Tritirachium album</i>)	3.4.21.64	P ₁ -P ₁ ¹ -(P ₁ = aromático, pref. hidrófobo)	P06873 ^S
Subtilisina (<i>Bacillus subtilis</i>)	3.4.21.62	P ₁ -P ₁ ¹ -(P ₁ = pref. neutro/ácido)	P04189 ^S
Clostripaína (endoproteinasa-Arg-C) (<i>Clostridium histolyticum</i>)	3.4.22.8	-Arg-P ₁ -(P ₁ = pref. Pro)	P09870 ^S
Carboxipeptidasa A (bovina)	3.4.17.1	P ₁ -P ₁ ¹ -(P ₁ no puede ser Arg, Lys, Pro)	P00730 ^S
Carboxipeptidasa B (porcina)	3.4.17.2	P ₁ -P ₁ ¹ -(P ₁ = Lys, Arg)	P00732 ^S
Carboxipeptidasa P (<i>Penicillium janthinellum</i>)	φ	P ₁ -P ₁ ¹ -(no específico)	-
Carboxipeptidasa Y (levadura)	3.4.16.5	P ₁ -P ₁ ¹ - (no específico)	P00729 ^S
Catepsina C	3.4.14.1	X-P ₁ -P ₁ ¹ - (elimina dipéptido aminoterminal)	-
Enzima liberadora de acilaminoácido (porcina)	3.4.19.1	Ac-P ₁ -P ₁ ¹ - (P ₁ = pref. Ser, Ala, Met)	P19205 ^{S+}
Proteasa ^a	N.º EC	Selectividad de enlace peptídico	N.º de acceso ejemplar ^b
Piroglutamato aminopeptidasa (bovina)	3.4.19.3	P ₁ -P ₁ ¹ -(P ₁ = 5-oxoprolina o piroglutamato)	-

^aFuente ejemplar mostrada en paréntesis

^bS = SwissProt; P = PIR; + = secuencia porcina; ϕ = secuencias parciales de Asp-N; números de acceso: AAB35279, AAB35280, AAB35281, AAB35282

En algunas realizaciones, la primera digestión se consigue usando un compuesto químico. Compuestos químicos especialmente útiles incluyen los que escinden polipéptidos de una manera específica de sitio. Dichos compuestos químicos incluyen bromuro de cianógeno (CNBr; bromuro carbonitrídico), que escinde el extremo C de residuos de metionina; 2-nitro-5-tiocianobenzoato (NTCB), que escinde de forma N-terminal residuos de cisteína; los dipéptidos de asparagina-glicina pueden escindirse usando hidroxilamina; ácido fórmico, que escinde en enlaces peptídicos de ácido aspártico-prolina (Asp-Pro), y BNPS-escatol (3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenil)sulfanilindol), que escinde el extremo C de residuos de triptófano. Un experto en la materia comprende la manera de seleccionar variables apropiadas, incluyendo la concentración de polipéptido, concentración de compuesto químico, tiempo de incubación y temperatura, *etc.* Véase también, por ejemplo, (Crimmins *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2014).

La primera digestión puede incluir múltiples digestiones secuenciales, en donde al menos una de dichas digestiones secuenciales comprende usar un compuesto químico, tal como CNBr, NTCB, hidroxilamina, ácido fórmico y BNPS-escatol. Por ejemplo, una primera digestión se realiza con un compuesto químico que escinde el polipéptido en al menos dos fragmentos, y después en una reacción posterior, una segunda digestión se realiza con una proteasa (en donde la proteasa no es elastasa de neutrófilos), o viceversa. Una segunda (o más) digestión se completa para mejorar la especificidad de la elastasa de neutrófilos usada en la etapa de escisión del polipéptido adicionalmente con la elastasa de neutrófilos.

En los métodos divulgados, una posterior digestión se realiza con una elastasa de neutrófilos. En algunas realizaciones, la elastasa de neutrófilos es humana.

En algunas realizaciones, una relación de proteína: elastasa de neutrófilos (humana) (p/p) de 10:1, 20:1, 25:1, 50:1 o 100:1 puede usarse. En algunas realizaciones, la relación es 20:1. En algunas realizaciones, la elastasa de neutrófilos usada está a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml-1 mg/ml, o aproximadamente 100 ng/ml-500 μ g/ml, o aproximadamente 100 ng/ml-100 μ g/ml, o aproximadamente 1 μ g/ml-1 mg/ml, o aproximadamente 1 μ g/ml-500 μ g/ml, o aproximadamente 1 μ g/ml-100 μ g/ml, o aproximadamente 10 μ g/mg-1 mg/ml, o aproximadamente 10 μ g/mg-500 μ g/ml, o aproximadamente 10 μ g/mg-100 μ g/ml. En algunas realizaciones, la etapa de digestión es durante 10 minutos a 48 horas, o de 30 minutos a 48 horas, o de 30 minutos a 24 horas, o de 30 minutos a 16 horas, o de 1 hora a 48 horas, o de 1 hora a 24 horas, o de 1 hora a 16 horas, o de 1 a 8 horas, o de 1 a 6 horas, o de 1 a 4 horas. En algunas realizaciones, la etapa de digestión se incuba durante 35 minutos. En algunas realizaciones, la etapa de digestión se incuba a una temperatura entre 20 °C y 45 °C, o entre 20 °C y 40 °C, o entre 22 °C y 40 °C, o entre 25 °C y 37 °C. En algunas realizaciones, la etapa de digestión se incuba a 37 °C. Un experto en la materia puede comprender los diversos parámetros y puede seleccionar las condiciones apropiadas para la digestión con elastasa de neutrófilos.

División de la muestra en alícuotas

En realizaciones, antes de digerir la muestra que comprende el polipéptido a analizar con elastasa de neutrófilos, la muestra se divide en alícuotas. En algunos casos, dividir la muestra en alícuotas se realiza simplemente tomando la mitad del volumen de la muestra antes de digerirla con elastasa de neutrófilos.

Selección del filtro

Cuando se elige el PCPM apropiado para aplicaciones específicas, habitualmente se consideran muchos factores, incluyendo la concentración de la muestra, la composición, la forma molecular y las condiciones de funcionamiento tales como la temperatura, la presión y la velocidad de flujo cruzado. Otras variables con respecto al flujo de paso de la molécula también se integran. Por ejemplo, las moléculas lineales, la alta presión transmembranaria (TMP) y la baja concentración de muestra pueden aumentar el paso de la molécula, mientras que una baja temperatura y la obstrucción de la membrana pueden disminuir el paso de la molécula. Los métodos de caracterización para PCPM no son siempre comparables, ya que varían entre fabricantes. En la técnica, se aconseja habitualmente seleccionar un PCPM que sea al menos dos veces más pequeño que el peso molecular del soluto que se está reteniendo.

Para los métodos divulgados, también se considera la forma de filtro. Para volúmenes de 1-2 ml, las unidades de filtro donde el filtro está inclinado cuando la unidad de filtro es perpendicular al suelo, son menos deseable que aquellas donde el filtro está horizontal cuando la unidad de filtro es perpendicular al suelo.

Los materiales adecuados para la membrana de PCPM son hidrófilos. Materiales hidrófilos adecuados incluyen polietersulfona, difluoruro de polivinilideno y celulosa regenerada.

Pueden obtenerse filtros de punto de corte adecuado en el mercado, tal como de Pall Corporation (Port Washington, NY) o Millipore, Inc (Burlington, MA, tales como filtros Microcon®). Para los métodos divulgados, los filtros de estos

fabricantes particulares tienen especificaciones de PCPM que son adecuadas. También pueden usarse filtros comparables de otros fabricantes. Las especificaciones de PCPM proporcionadas por los fabricantes pueden depender, porque incluso justificando las diferencias entre las clasificaciones de PCPM entre fabricantes, los métodos divulgados aprovechan en parte la observación sorprendente de que moléculas con pequeño peso molecular se retienen por el filtro aunque estas moléculas tengan un peso molecular que sea igual a o menor de (y a menudo sustancialmente menor de) el PCPM clasificado del filtro (véase, por ejemplo, el ejemplo 11).

La filtración de la muestra usando filtros de PCPM puede usar cualquier método de filtro adecuado, usando cualquier dispositivo de filtro adecuado. La filtración puede tener lugar por gravedad, fuerza capilar o habitualmente centrifugación, incluyendo ultracentrifugación.

Análisis de la muestra

Después de haber digerido el polipéptido con elastasa de neutrófilos, el fragmento polipeptídico resultante puede analizarse por cualquier método adecuado. El siguiente análisis no pretende limitar de ninguna manera los métodos que pueden usarse para analizar los polipéptidos preparados.

En general, los métodos analíticos adecuados pueden ser cromatográficos, electroforéticos y espectrométricos. Algunos de estos métodos pueden combinarse.

Un experto en la materia tiene acceso a, por ejemplo, manuales, que facilitan la selección de métodos analíticos apropiados, así como condiciones apropiadas para realizar esos métodos, incluyendo, por ejemplo, (Gunzler y Williams, 2001).

Los métodos cromatográficos son aquellos métodos que separan fragmentos polipeptídicos en una fase móvil, que es una fase que se procesa a través de una estructura que aloja una fase estacionaria. Como los fragmentos polipeptídicos son de diferentes tamaños y composiciones, cada fragmento tiene su propio coeficiente de reparto. A causa de los diferentes coeficientes de reparto, los polipéptidos se retienen de forma diferencial en la fase estacionaria. Ejemplos de dichos métodos conocidos en la técnica incluyen cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de líquidos de ultrarrendimiento, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de adsorción en lecho expandido, cromatografía en fase inversa y cromatografía de interacción hidrófoba.

Se muestra un resumen de algunos de los métodos cromatográficos conocidos en la tabla E.

Tabla E

<u>Ejemplos de métodos cromatográficos</u>	
Tipo cromatográfico	Descripción
Adsorción	Fase estacionaria adsorbente
Afinidad	Basada en una interacción altamente específica, tal como entre antígeno y anticuerpo o receptor y ligando, inmovilizándose una de estas sustancias y actuando como sorbente
Columna	Los diversos solutos de una solución viajan de forma descendente en una columna de absorción donde los componentes individuales se absorben por la fase estacionaria. El componente más fuertemente adsorbido permanecerá cerca de la parte superior de la columna; los otros componentes pasarán a posiciones más alejadas descendentes de la columna de acuerdo con su afinidad por el adsorbente
Exclusión (incluyendo filtración en gel, permeación en gel, exclusión molecular, filtración en gel de tamiz molecular)	La fase estacionaria es un gel que tiene un tamaño de poro muy controlado. Las moléculas se separan en función del tamaño y forma molecular; reteniéndose temporalmente las moléculas más pequeñas en los poros
Adsorción en lecho expandido (EBA)	Útil para soluciones viscosas y en partículas. Se usa para las partículas en fase sólida que están en estado fluido, en donde se crea un gradiente de tamaño de partícula.
Gases (GC)	Un gas inerte mueve los vapores de los materiales a separar a través de una columna de material inerte
Gases-líquidos (GLC)	Cromatografía de gases donde el sorbente es un líquido no volátil recubierto sobre un soporte sólido
Gases-sólidos (GSC)	Cromatografía de gases donde el sorbente es un sólido poroso inerte

Ejemplos de métodos cromatográficos	
Tipo cromatográfico	Descripción
De líquidos de alto rendimiento, de líquidos de alta presión (HPLC).	La fase móvil es un líquido que se fuerza a alta presión a través de una columna compactada con un sorbente
Cromatografía de interacción hidrófoba	La matriz se sustituye con grupos hidrófobos (tales como metilo, etilo, propilo, octilo o fenilo). A altas concentraciones salinas, las cadenas laterales apolares en las superficies del polipéptido interactúan con los grupos hidrófobos; es decir, ambos tipos de grupos se excluyen por un disolvente polar; la elución se consigue con concentraciones decrecientes salinas, crecientes de detergente, y/o cambios en el pH.
Intercambio iónico	La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico a la que se le acoplan cationes o aniones que se intercambian con otros cationes o aniones en el material que pasa a través.
Papel	Se usa papel para la adsorción
Reparto	El reparto de los solutos se produce entre dos fases líquidas (el disolvente original y la película de disolvente en una columna de adsorción)
Fase inversa	Cualquier cromatografía de líquidos en que la fase móvil es significativamente más polar que la fase estacionaria. Las moléculas hidrófobas en la fase móvil se adsorben en la fase estacionaria hidrófoba; las moléculas hidrófilas en la fase móvil tienen a eluir en primer lugar.
Capa fina (TLC)	Cromatografía a través de una capa fina de material inerte, tal como celulosa
De líquidos de ultrarrendimiento (UPLC)	Una técnica cromatográfica de líquidos que usa una fase sólida con partículas de menos de 2,5 µm (más pequeñas que en HPLC) y tiene mayores caudales; la presión usada es 2-3 veces mayor que en HPLC.

5 Los polipéptidos preparados pueden analizarse también usando métodos electroforéticos - electroforesis en gel, electroforesis de flujo libre, electroenfoque, isotacoforesis, electroforesis de afinidad, inmunoelectroforesis, contraelectroforesis, electroforesis capilar y electroforesis de zona capilar. Están disponibles resúmenes y manuales para los expertos en la materia, tales como (Kurien y Scofield, 2012; Lord, 2004).

10 La electroforesis puede usarse para analizar moléculas cargadas, tales como polipéptidos que no están en su punto isoeléctrico, que se transportan a través de un disolvente por un campo eléctrico. Los polipéptidos migran a una tasa proporcional a su densidad de carga. La movilidad de un polipéptido a través de un campo eléctrico depende de: la fuerza del campo, la carga neta en el polipéptido, el tamaño y la forma del polipéptido, la fuerza iónica y las propiedades de la matriz a través de la que migra el polipéptido (por ejemplo, viscosidad, tamaño de poro). La poliacrilamida y la agarosa son dos matrices de soporte comunes. Estas matrices sirven como medio poroso y se comportan como un tamiz molecular. La poliacrilamida forma soportes con tamaños de poro más pequeños y es especialmente útil en los métodos divulgados, lo que es ideal para separar la mayoría de fragmentos polipeptídicos.

15 La tabla F presenta ejemplos de técnicas electroforéticas para polipéptidos.

Tabla F

Ejemplos de métodos electroforéticos	
Técnica	Descripción
Electroforesis en gel	Se refiere a técnicas electroforéticas que usan un gel como matriz a través del que viajan los polipéptidos. Muchas técnicas electroforéticas usan geles, incluyendo aquellos basados en poliacrilamida (electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), incluyendo PAGE desnaturizante y no desnaturizante). El tamaño de poro de los geles de poliacrilamida se controla al modular las concentraciones de acrilamida y bisacrilamida (que reticula los monómeros de acrilamida)
Electroforesis de flujo libre (electroforesis sin soporte)	No se usan matrices; en su lugar, los polipéptidos migran a través de una solución; rápida, alta reproducibilidad, compatible con técnicas de detección posteriores; puede ejecutarse en condiciones naturales o desnaturizantes; solamente se requieren pequeños volúmenes de muestra (aunque puede usarse como técnica preparativa) y
Electroenfoque (isoelectroenfoque)	Los polipéptidos se separan por diferencias en su punto isoelectrónico (pI), habitualmente realizado en geles basados en el principio de que la carga global en el polipéptido es una función del pH. Se usa una solución de anfólito para preparar geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG). El gradiente de pH inmovilizado se obtiene mediante el cambio continuo en la relación de inmovilinas (ácido o base débil definida por pK). Los polipéptidos migran a través del gradiente de pH hasta que su carga es 0. Muy alta resolución, que separa polipéptidos que difieren en una sola carga
Isotacoforesis (ITP)	Ordena y concentra polipéptidos de movilidades de eficacia intermedia entre un ion de movilidad altamente eficaz y uno de movilidad de eficacia mucho menor, seguido de su migración a una velocidad uniforme. Se introduce una muestra multianalito entre el electrólito principal (LE, que contiene el ion principal) y el electrólito terminador (TE, que contiene el ion terminador) donde el ion principal, el ion terminador y los componentes de muestra tienen la misma polaridad de carga, y los iones de la muestra deben tener movilidades electroforéticas menores que el ion principal, pero más grandes que el ion terminador. Después de la electroforesis, los polipéptidos se mueven directamente detrás del ion principal y delante del ion terminador, formando zonas contiguas diferenciadas en orden de sus movilidades electroforéticas. La ITP transitoria incluye una etapa adicional de separación después de ITP con electroforesis zonal.
Electroforesis de afinidad	Basada en las cargas en el patrón electroforético de las moléculas a través de interacciones específicas con otras moléculas o formación de complejos; ejemplos incluyen electroforesis de desplazamiento de movilidad, desplazamiento de carga y capilar de afinidad. Se conocen diversos tipos, incluyendo los que usan gel de agarosa, gel de agarosa rápido, afinidad por boronato, poliacrilamida de afinidad-retención, y electroforesis de afinidad por fosfato
Inmunoelectroforesis	Separa los polipéptidos en función de electroforesis y reacción con anticuerpos. Incluye análisis inmunoelectroforético (inmunoelectroforesis unidimensional), inmunoelectroforesis cruzada (inmunoelectroforesis cuantitativa bidimensional), inmunoelectroforesis de cohete (inmunoelectroforesis cuantitativa unidimensional), inmunoelectroforesis de cohete fusionado y inmunoelectroforesis de afinidad. A menudo usa geles de agarosa tamponados a alto pH

Ejemplos de métodos electroforéticos	
Técnica	Descripción
Contraelectroforesis (contrainmunolectroforesis)	El anticuerpo y el antígeno migran a través de un medio de difusión tamponado. Antígenos en un gel con un pH controlado están fuertemente cargados negativamente y migran rápidamente a través del campo eléctrico hacia el ánodo. El anticuerpo en dicho medio está menos cargado negativamente y migra en la dirección opuesta hacia el cátodo. Si el antígeno y el anticuerpo son específicos entre sí, se combinan y forman una línea de precipitación característica.
Electroforesis capilar	Se refiere a métodos de separación electrocinética realizados en capilares de diámetro submilimétrico y en canales de micro- y nanofluidos. Ejemplos incluyen electroforesis de zona capilar (CZE), electroforesis en gel capilar (CGE), enfoque isoeléctrico capilar (CIEF), isotacoforesis capilar y cromatografía electrocinética micelar (MEKC).
Electroforesis de zona capilar	Un tipo de electroforesis capilar, CZE separa iones en función de su carga y las fuerzas de fricción dentro de un capilar de orificio fino. Sensible en el intervalo picomolar

Lo polipéptidos preparados pueden analizarse también usando métodos espectrométricos - espectrometría de masas (Rubakhin y Sweedler, 2010), espectrometría ultravioleta, espectrometría en luz visible, espectrometría fluorescente y espectrometría en luz ultravioleta-visible (Nowicka-Jankowska, 1986).

5

La tabla G presenta ejemplos de técnicas electroforéticas para polipéptidos.

Tabla G

Ejemplos de métodos espectrométricos	
Técnica	Descripción
Espectrometría de masas (MS)	Las moléculas de muestra se ionizan por electrones de alta energía. La relación de masa a carga de estos iones se mide por aceleración electrostática y perturbación del campo magnético, proporcionando un peso molecular preciso. Los patrones de fragmentación iónica pueden relacionarse con la estructura del ion molecular. El espectro de masas es un diagrama de la señal iónica como una función de la relación de masa a carga. Los analizadores incluyen analizadores de masa de campo de sector, de tiempo de vuelo (TOF) y de masa de cuadrupolo. Las trampas de iones incluyen trampas de iones de cuadrupolo tridimensional, cilíndricas, de cuadrupolo lineal y Orbitrap. Los detectores incluyen multiplicadores electrónicos, jaulas de Faraday y detectores de iones a fotones. Variaciones de MS incluyen MS en tándem. Los espectrómetros de masas pueden configurarse en una diversidad de maneras, incluyendo fuente de desorción/ionización láser asistida por matriz configurada con un analizador TOF (MALDI-TOF); espectrometría de masas por ionización por electronebulización (ESI-MS), espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), espectrometría de masas con acelerador (AMS), espectrometría de masas con ionización térmica (TIMS) y espectrometría de masas con fuente de chispa (SSMS).
Ultravioleta-visible	La absorción de luz UV de alta energía provoca excitación electrónica. Longitudes de onda de 200 a 800 nm muestran absorción si se están presentes sistemas de electrones pi conjugados
Espectroscopia	
Espectroscopia de infrarrojos	La absorción de radiación infrarroja provoca excitación vibratoria y rotatoria de grupos de átomos dentro del polipéptido. A causa de sus absorciones características, se identifican grupos funcionales

10 El principio que posibilita la espectrometría de masas (MS) consiste en ionizar compuestos químicos para generar moléculas o fragmentos de molécula cargados, y después medir sus relaciones de masa a carga. En un procedimiento de MS ilustrativo, se carga una muestra en el instrumento de MS y experimenta vaporización, los componentes de la muestra se ionizan por uno de una diversidad de métodos (por ejemplo, al impactarlos con un haz de electrones), lo que provoca la formación de partículas cargadas positivamente, los iones positivos entonces se aceleran por un campo magnético, se realizan cálculos sobre la relación de masa a carga (m/z) de las partículas en función de los detalles de

15

movimiento de los iones según transitan a través de los campos electromagnéticos y, detección de los iones, que se han clasificado de acuerdo con sus relaciones de m/z.

5 Un instrumento de MS ilustrativo tiene tres módulos: una fuente de iones, que convierte en iones las moléculas de muestra en fase gaseosa (o, en el caso de ionización por electronebulización, mueve los iones que existen en solución a la fase gaseosa); un analizador de masas, que clasifica los iones por sus relaciones de masa a carga al aplicar campos electromagnéticos; y un detector, que mide el valor de una cantidad de indicador y, por tanto, proporciona datos para calcular las abundancias de cada ion presente.

10 La técnica de MS tiene tanto usos cualitativos como cuantitativos, incluyendo identificar compuestos desconocidos, determinar la composición isotópica de elementos en una molécula, y determinar la estructura de un compuesto al observar si fragmentación. Se incluye cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS o GC-MS), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC/MS o LC-MS) y espectrometría de movilidad de iones/espectrometría de masas (IMS/MS o IMMS).

15 Los métodos analíticos (cromatográficos, electroforéticos y espectrométricos) pueden combinarse. Por ejemplo, combinaciones tales como cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, electroforesis de zona capilar acoplada a espectrometría de masas y espectrometría de movilidad de iones-espectrometría de masas.

20 **Automatización**

Las diversas etapas de los métodos divulgados pueden realizarse usando robots de manipulación de líquidos. Dichos robots dosifican reactivos, muestras u otros líquidos a un recipiente indicado. Los robots se controlan por un programa informático, integrado directamente en el propio robot, o por un ordenador conectado. Al automatizar la manipulación de líquidos, los métodos divulgados pueden realizarse con alto rendimiento, menos errores y tiempo reducido en las manos del analista.

30 Los robots de manipulación de líquidos pueden configurarse para usar diversos instrumentos de laboratorio, tales como centrífugas, máquinas de PCR, selector de colonias, dispositivos de agitación, dispositivos de calentamiento, etc. Dicha personalización permite adaptar estas máquinas a un método particular.

En algunos casos, dichos robots remplazan el uso de pipetas y/o jeringas al usar sonido para mover líquidos (manipulación acústica de líquidos).

35 Actualmente, Agilent Technologies (Santa Clara, CA), Beckman Coulter, Inc. (Indianápolis, IN), Eppendorf North America (Hauppauge, NY), Hamilton Robotics (Reno, NV), Hudson Robotics, Inc. (Springfield, NJ) y Tecan AG (Männedorf, Suiza) son algunos de los fabricantes de dichos robots.

40 **Polipéptidos terapéuticos**

Los polipéptidos, incluyendo los que se unen a uno o más de los siguientes, pueden prepararse y analizarse en los métodos divulgados. Estos incluyen proteínas CD, incluyendo CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD30 y CD34; incluyendo los que interfieren con la unión al receptor. Proteínas de la familia de receptores HER, que incluyen, HER2, HER3, HER4 y el receptor de EGF. Moléculas de adhesión celular, por ejemplo, LFA-I, Mol, p150, 95, VLA-4, ICAM-I, VCAM e integrina alfa v/beta 3. Factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento del endotelio vascular ("VEGF"), hormona del crecimiento, hormona estimulante del tiroides, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, factor liberador de la hormona del crecimiento, hormona paratiroidea, hormona antimuleriana, proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-I-alfa), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de fibroblastos, incluyendo, por ejemplo, aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformante (TGF), incluyendo, entre otros, TGF- α y TGF- β , incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5, factores de crecimiento similares a insulina-I y -II (IGF-I y IGF-II), des(I-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), y factores osteoinductores. Las insulinas y proteínas relacionadas con la insulina, incluyendo la insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, proinsulina y proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina. Proteínas de coagulación y relacionadas con la coagulación, tales como, entre otros, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrand, proteína C, alfa-1-antitripsina, activadores del plasminógeno, tales como urocinasa y activador tisular del plasminógeno ("t-PA"), bombesina, trombina y trombopoyetina; (vii) otras proteínas sanguíneas y séricas, incluyendo, aunque sin limitación, albúmina, IgE y antígenos de grupos sanguíneos. Factores estimulantes de colonias y receptores de los mismos, incluyendo los siguientes, entre otros, M-CSF, GM-CSF y G-CSF, y receptores de los mismos, tales como el receptor de CSF-1 (c-fms). Receptores y proteínas asociadas a receptor, incluyendo, por ejemplo, receptor flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptor de LDL, receptores de la hormona del crecimiento, receptores de trombopoyetina ("TPO-R," "c-mp1"), receptores de glucagón, receptores de interleucina, receptores de interferón, receptores de linfocitos T, receptores del factor de células madre, tales como c-Kit, y otros receptores. Ligandos de receptor, incluyendo, por ejemplo, OX40L, el ligando para el receptor OX40. Factores neurotróficos, incluyendo factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF) y neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6). Cadena A de relaxina, cadena B de relaxina y prorrelaxina; interferones y receptores de interferones, incluyendo, por ejemplo, interferón- α , - β y - γ , y sus receptores.

Interleucinas y receptores de interleucinas, incluyendo IL-1 a IL-33 y receptores de IL-1 a IL-33, tal como el receptor de IL-8, entre otros. Antígenos víricos, incluyendo un antígeno vírico de la envoltura del virus del SIDA. Lipoproteínas, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa y -beta, encefalina, RANTES (regulado después de la activación de linfocitos T normales, expresados y secretados), péptido asociado a gonadotropina de ratón, DNasa, inhibina y activina. Integrina, proteína A o D, factores reumatoides, inmunotoxinas, proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa, proteínas de la membrana superficial, factor acelerador de descomposición (DAF), envoltura del virus del SIDA, proteínas de transporte, receptores de migración dirigida, adhesinas, proteínas reguladoras, inmunoadhesinas, anticuerpos. Miostatinas, proteínas TALL, incluyendo TALL-I, proteínas amiloides, incluyendo, aunque sin limitación, proteínas de amiloide-beta, linfoproteínas estromales tímicas ("TSLP"), ligando de RANK ("OPGL"), c-kit, receptores de TNF, incluyendo receptor de tipo 1 de TNF, TRAIL-R2, angiopoyetinas, y fragmentos biológicamente activos o análogos o variantes de cualquiera de los anteriores.

Polipéptidos y anticuerpos ejemplares incluyen Activase® (Alteplase); alirocumab, Aranesp® (Darbeopetina-alfa), Epogen® (Epoetina alfa, o eritropoyetina); Avonex® (Interferón β-1a); Bexxar® (Tositumomab); Betaseron® (Interferón-β); bococizumab (anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 denominado L1L3, véase el documento US8080243); Campath® (Alemtuzumab); Dynepo® (Epoetina delta); Velcade® (bortezomib); MLN0002 (mAb anti-α4β7); MLN1202 (mAb antirreceptor de quimiocina CCR2); Enbrel® (etanercept); Eprex® (Epoetina alfa); Erbitux® (Cetuximab); evolocumab; Genotropin® (Somatotropina); Herceptin® (Trastuzumab); Humatrope® (somatotropina [origen de ADN] para inyección); Humira® (Adalimumab); Infergen® (Interferón Alfacon-1); Natrecor® (nesiritide); Kineret® (Anakinra, Leukine® (Sargamostim); LymphoCide® (Epratuzumab); Benlysta™ (Belimumab); Metalyse® (Tenecteplasa); Mircera® (metoxi polietilenglicol-epoetina beta); Mylotarg® (Gemtuzumab ozogamicina); Raptiva® (efalizumab); Cimzia® (certolizumab pegol); Soliris™ (Eculizumab); Pexelizumab (Anticomplemento C5); MEDI-524 (Numax®); Lucentis® (Ranibizumab); Edrecolomab (Panorex®); Trabio® (Irdelimumab); TheraCim hR3 (Nimotuzumab); Omnitarg (Pertuzumab, 2C4); Osidem® (IDM-I); OvaRex® (B43.13); Nuvion® (visilizumab); Cantuzumab mertansina (huC242-DMI); NeoRecormon® (Epoetina beta); Neumega® (Oprelvekin); Neulasta® (filgrastim pegilado, G-CSF pegilado, hu-Met-G-CSF pegilado); Neupogen® (Filgrastim); Orthoclone OKT3® (Muromonab-CD3), Procrit® (Epoetina alfa); Remicade® (Infliximab), Reopro® (Abciximab), Actemra® (mAb antirreceptor de IL6), Avastin® (Bevacizumab), HuMax-CD4 (zanolimumab), Rituxan® (Rituximab); Tarceva® (Erlotinib); Roferon-A® (Interferón alfa-2a); Simulect® (Basiliximab); Stelara™ (Ustekinumab); Prexige® (lumiracoxib); Synagis® (Palivizumab); 146B7-CHO (anticuerpo anti-IL15, véase el documento US7153507), Tysabri® (Natalizumab); Valortim® (MDX-1303, mAb antiantígeno protector de *B. anthracis*); ABthrax™; Vectibix® (Panitumumab); Xolair® (Omalizumab), ETI211 (mAb anti-MRSA), IL-1 Trap (la parte Fc de IgG1 humana y los dominios extracelulares de ambos componentes del receptor de IL-1 (el receptor de tipo I y la proteína accesoria del receptor)), VEGF Trap (dominios de Ig de VEGFR1 fusionados a Fc de IgG1), Zenapax® (Daclizumab); Zenapax® (Daclizumab), Zevalin® (Ibritumomab tiuxetán), Zetia (ezetimibe), Atacept (TACI-Ig), mAb anti-α4β7 (vedolizumab); galiximab (anticuerpo monoclonal anti-CD80), mAb anti-CD23 (lumiliximab); BR2-Fc (proteína de fusión de huBR3/huFc, antagonista de BAFF soluble); Simponi™ (Golimumab); Mapatumumab (mAb humano antirreceptor-1 de TRAIL); Ocrelizumab (mAb anti-CD20 humana); HuMax-EGFR (zalutumumab); M200 (Volociximab, mAb antiintegrina α5β1); MDX-010 (Ipilimumab, mAb anti-CTLA-4 y VEGFR-1 (IMC-18F1); mAb anti-BR3; mAb antitoxin A y toxin B C de *C. difficile* MDX-066 (CDA-I) y MDX-1388); conjugados de dsFv anti-CD22 - PE38 (CAT-3888 y CAT-8015); mAb anti-CD25 (HuMax-TAC); anticuerpos anti-TSLP; anticuerpo antirreceptor de TSLP (documento US8101182); anticuerpo anti-TSLP denominado A5 (documento US7982016); (mAb anti-CD3 (NI-0401); Adecatumumab (MT201, mAb anti-EpCAM-CD326); MDX-060, SGN-30, SGN-35 (mAb anti-CD30); MDX-1333 (anti-IFNAR); HuMax CD38 (mAb anti-CD38); mAb anti-CD40L; mAb anti-Cripto; anti-CTGF fibrinógeno de fase I de fibrosis pulmonar idiopática (FG-3019); mAb anti-CTLA4; mAb anti-eotaxin1 (CAT-213); mAb anti-FGF8; mAb anti-gangliósido GD2; anticuerpos antiesclerostina (véase el documento US8715663 o US7592429) anticuerpo antiesclerostina denominado Ab-5 (documento US8715663 o US7592429); mAb antigangliósido GM2; mAb anti-GDF-8 humano (MYO-029); mAb antirreceptor de GM-CSF (CAM-3001); mAb anti-HepC (HuMax HepC); MEDI-545, MDX-1103 (mAb anti-IFNα); mAb anti-IGFIR; mAb anti-IGF-IR (HuMax-Inflam); mAb anti-IL12/IL23p40 (Briakinumab); mAb anti-IL-23p19 (LY2525623); mAb anti-IL13 (CAT-354); mAb anti-IL-17 (AIN457); mAb anti-IL2Ra (HuMax-TAC); mAb antirreceptor de IL5; mAb antirreceptores de integrina (MDX-Oi8, CNTO 95); mAb anti-IPIO colitis ulcerosa (MDX-1100); anticuerpo anti-LLY; BMS-66513; mAb antirreceptor de manosa/hCGβ (MDX-1307); conjugado de dsFv antimesotelina-PE38 (CAT-5001); mAb anti-PDI (MDX-1 106 (ONO-4538)); anticuerpo anti-PDGFRα (IMC-3G3); mAb anti-TGFβ (GC-1008); mAb antirreceptor-2 de TRAIL humano (HGS-ETR2); mAb anti-TWEAK; mAb anti-VEGFR/Fit-1; mAb anti-ZP3 (HuMax-ZP3); anticuerpo NVS n.º 1; anticuerpo NVS n.º 2; y un anticuerpo monoclonal contra amiloide-beta.

Ejemplos de anticuerpos adecuados para los métodos y formulaciones farmacéuticas incluyen los anticuerpos mostrados en la tabla H. Otros ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen infliximab, bevacizumab, cetuximab, ranibizumab, palivizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab pegol, ald518, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, anatumomab mafenatox, anrukizumab, apolizumab, arcitumomab, aselizumab, altinumab, atlizumab, atorolimiumab, tocilizumab, bapineuzumab, basiliximab, bavituximab, bectumomab, belimumab, benralizumab, bertilimumab, besilesomab, bevacizumab, bezlotoxumab, biciromab, bivatumumab, bivatumumab mertansina, blinatumomab, blosozumab, brentuximab vedotin, briakinumab, brodalumab, canakinumab, cantuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, caplacizumab, capromab pendetide, carlumab, catumaxomab, cc49, cedelizumab, certolizumab pegol, cetuximab, citatumumab bogatox, cixutumumab, clazakizumab, clenoliximab, clivatuzumab tetraxetán, conatumumab, crenezumab,

cr6261, dacetuzumab, daclizumab, dalotuzumab, daratumumab, demcizumab, denosumab, detumomab, dorlimomab
 aritox, drozitumab, duligotumab, dupilumab, ecomeximab, eculizumab, edobacomab, edrecolomab, efalizumab,
 5 efungumab, elotuzumab, elsilimomab, enavatumab, enlimomab pegol, enokizumab, enoticumab, ensituximab,
 epitumomab cituxetán, epratuzumab, erenumab, erlizumab, ertumaxomab, etaracizumab, etrolizumab, evolocumab,
 10 exbivirumab, fanolesomab, faralimomab, farletuzumab, fasinumab, fbta05, felvizumab, fezakinumab, ficlatuzumab,
 figitumumab, flanvotumab, fontolizumab, foralumab, foravirumab, fresolimomab, fulranumab, futuximab, galiximab,
 ganitumab, gantenerumab, gavilimomab, gemtuzumab ozogamicina, gevokizumab, girentuximab, glembatumumab
 vedotín, golimumab, gomiliximab, gs6624, ibalizumab, ibritumomab tiuxetán, icrucumab, igovomab, imciromab,
 15 imgatuzumab, inclacumab, indatuximab ravtansina, infliximab, intetumumab, inolimomab, inotuzumab ozogamicina,
 ipilimumab, iratumumab, itolizumab, ixekizumab, keliximab, labetuzumab, lebrikizumab, lemalesomab, lerdelimomab,
 lexatumumab, libivirumab, ligelizumab, lintuzumab, lirilumab, lorvotuzumab mertansine, lucatumumab, lumiliximab,
 mapatumumab, maslimomab, mavrilimumab, matuzumab, mepolizumab, metelimumab, milatuzumab, minretumomab,
 mitumomab, mogamulizumab, morolimomab, motavizumab, moxetumomab pasudotox, muromonab-cd3, nacolomab
 tafenatox, namilumab, naptumomab estafenatox, narnatumab, natalizumab, nebacumab, necitumumab, nerelimomab,
 20 nesvacumab, nimotuzumab, nivolumab, nofetumomab merpentán, ocaratuzumab, ocrelizumab, odulimomab,
 ofatumumab, olaratumab, olokizumab, omalizumab, onartuzumab, oportuzumab monatox, oregovomab, orticumab,
 otelixizumab, oxelumab, ozanezumab, ozoralizumab, pagibaximab, palivizumab, panitumumab, panobacumab,
 parsatumab, pascolizumab, pateclizumab, patritumab, pentumomab, perakizumab, pertuzumab, pexelizumab,
 pidilizumab, pintumomab, placulumab, ponezumab, priliximab, primumab, PRO 140, quilizumab, racotumomab,
 25 radretumab, rafivirumab, ramucirumab, ranibizumab, raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, rituximab,
 robatumumab, roledumab, romosozumab, rontalizumab, rovelizumab, ruplizumab, samalizumab, sarilumab,
 satumomab pendetide, secukinumab, sevirumab, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, simtuzumab, sipilizumab,
 sirukumab, solanezumab, solitomab, sonpocizumab, sontuzumab, stamulumab, sulesomab, suvizumab, tabalumab,
 tacatumab tetraxetán, tadocizumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab paptox, tefibazumab, telimomab aritox,
 30 tenatumomab, tefibazumab, teneliximab, teplizumab, teprotumumab, TGN1412, tremelimumab, ticilimumab,
 tildrakizumab, tigatuzumab, TNX-650, tocilizumab, toralizumab, tositumomab, tralokinumab, trastuzumab, TRBS07,
 tregalizumab, tucotuzumab celmoleucina, tuvirumab, ublituximab, urelumab, urtoxazumab, ustekinumab, vapaliximab,
 vatelizumab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimomab, vesencumab, visilizumab, volociximab, vorsetuzumab
 mafodotín, votumumab, zalutumumab, zanolimumab, zatuximab, ziralimumab, zolimomab aritox.

Los anticuerpos también incluyen adalimumab, bevacizumab, blinatumomab, cetuximab, conatumumab, denosumab,
 eculizumab, erenumab, evolocumab, infliximab, natalizumab, panitumumab, rilotumumab, rituximab, romosozumab,
 tezepelumab y trastuzumab, y anticuerpos seleccionados de la tabla H.

35 **Tabla H**

Ejemplos de anticuerpos terapéuticos					
Diana (nombre informal)	Tipo de HC* (incluyendo alotipos)	Tipo de LC*	pI	LC* SEQ ID NO:	HC* SEQ ID NO:
anti-amiloide	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	9,0	2	3
GMCSF (247)	IgG2	Kappa	8,7	4	5
CGRPR	IgG2	Lambda	8,6	6	7
RANKL	IgG2	Kappa	8,6	8	9
Esclerostina (27H6)	IgG2	Kappa	6,6	10	11
IL-1R1	IgG2	Kappa	7,4	12	13
Miostatina	IgG1 (z) (K;EM)	Kappa	8,7	14	15
B7RP1	IgG2	Kappa	7,7	16	17
Amiloide	IgG1 (za) (K;DL)	Kappa	8,7	18	19
GMCSF (3.112)	IgG2	Kappa	8,8	20	21
CGRP (32H7)	IgG2	Kappa	8,7	22	23
CGRP (3B6.2)	IgG2	Lambda	8,6	24	25
PCSK9 (8A3.1)	IgG2	Kappa	6,7	26	27
PCSK9 (492)	IgG2	Kappa	6,9	28	29
CGRP	IgG2	Lambda	8,8	30	31
Hepcidina	IgG2	Lambda	7,3	32	33
TNFR (p55)	IgG2	Kappa	8,2	34	35

Ejemplos de anticuerpos terapéuticos					
Diana (nombre informal)	Tipo de HC* (incluyendo alotipos)	Tipo de LC*	pI	LC* SEQ ID NO:	HC* SEQ ID NO:
OX40L	IgG2	Kappa	8,7	36	37
HGF	IgG2	Kappa	8,1	38	39
GMCSF	IgG2	Kappa	8,1	40	41
Glucagón R	IgG2	Kappa	8,4	42	43
GMCSF (4.381)	IgG2	Kappa	8,4	44	45
Esclerostina (13F3)	IgG2	Kappa	7,8	46	47
CD-22	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	8,8	48	49
INFR	IgG1 (za) (K;DL)	Kappa	8,8	50	51
Ang2	IgG2	Kappa	7,4	52	53
TRAILR2	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	8,7	54	55
EGFR	IgG2	Kappa	6,8	56	57
IL-4R	IgG2	Kappa	8,6	58	59
IL-15	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	8,8	60	61
IGF1R	IgG1 (za) (K;DL)	Kappa	8,6	62	63
IL-17R	IgG2	Kappa	8,6	64	65
Dkk1 (6.37.5)	IgG2	Kappa	8,2	66	67
Esclerostina	IgG2	Kappa	7,4	68	69
TSLP	IgG2	Lambda	7,2	70	71
Dkk1 (11H10)	IgG2	Kappa	8,2	72	73
PCSK9	IgG2	Lambda	8,1	74	75
GIPR (2G10.006)	IgG1 (z) (K;EM)	Kappa	8,1	76	77
Activina	IgG2	Lambda	7,0	78	79
Esclerostina (2B8)	IgG2	Lambda	6,7	80	81
Esclerostina	IgG2	Kappa	6,8	82	83
c-fms	IgG2	Kappa	6,6	84	85
$\alpha 4\beta 7$	IgG2	Kappa	6,5	86	87

*HC - cadena pesada del anticuerpo; LC - cadena ligera del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el polipéptido terapéuticos es una molécula de BiTE[®]. Las moléculas de BiTE[®] son anticuerpos monoclonales biespecíficos manipulados que dirigen la actividad citotóxica de los linfocitos T contra las células cancerosas. Son la fusión de dos fragmentos variables monocatenarios (scFv) de diferentes anticuerpos, o secuencias de aminoácidos de cuatro genes diferentes, en una sola cadena peptídica de aproximadamente 55 kilodalton. Uno de los scFv se une a linfocitos T mediante el receptor de CD3, y el otro a la célula tumoral mediante una molécula específica de tumor. Blinatumomab (BLINCYTO[®]) es un ejemplo de una molécula de BiTE[®], específica para CD19. Las moléculas de BiTE[®] que se modifican, tales como las modificadas para prolongar sus semividas, también pueden usarse en los métodos divulgados.

Ejemplos

La siguiente sección de ejemplos se da únicamente a modo de ejemplo y no se expone para limitar la divulgación o reivindicaciones de ninguna manera.

Ejemplo 1 - Preparación de reactivos para los ejemplos 2-4

El tampón desnaturizante (guanidina HCl 7 M, tris 100 mM, metionina 20 mM, pH 8,3) se preparó añadiendo 10 ml de clorhidrato de (hidroximetil)aminometano (tris) 1 M, pH 7,8 (Teknova, Hollister, CA, PIN T1078) a 87,5 ml de

guanidina HCl 8 M (Pierce, Rockford, IL, PIN 24115) seguido de la adición de 299 mg de L-metionina (J.T. Baker, PIN 2085-05). El pH de la solución se ajustó hasta pH 8,3 con ácido clorhídrico (HCl) 6 N (Sigma, St. Louis, MO, PIN 84429). El volumen se ajustó hasta 100 ml con agua de calidad de HPLC. La solución de reducción (DTT 500 mM) se preparó disolviendo 7,7 mg de ditiotreitól (DTT) pesado previamente (Pierce, Rockford, IL, PIN 20291) en 100 μ l de tampón desnaturizante. La solución de alquilación (NaIAA 500 mM) se preparó disolviendo 15-65 mg de yodoacetato de sodio (NaIAA) (Sigma, St. Louis, MO, PIN I-9148) en un volumen de tampón desnaturizante suficiente para producir NaIAA 500 mM. El tampón de digestión (tris 100 mM, metionina 20 mM, pH 7,8) se preparó disolviendo 299 mg de L-metionina en 10 ml de tris 1 M, pH 7,8 y añadiendo 100 ml de agua de calidad de HPLC. El pH de la solución se ajustó hasta pH 7,8 con HCl, y el volumen se ajustó hasta 100 ml con agua de calidad de HPLC. Las soluciones enzimáticas (1 mg/ml de tripsina, 1 mg/ml de HNE) se prepararon añadiendo 100 μ l de tampón de digestión a 100 μ g de tripsina (Roche, Basilea, Suiza, PIN 03708969001) o 100 μ g de HNE (Elastin Products Company, Owensville, MO, PIN SE563). La solución de inactivación de digestión (10 % de TFA) se preparó añadiendo 1,0 ml de ácido trifluoroacético (TFA) al 100 % (Pierce, Rockford, IL, PIN 28904) a 9,0 ml de agua de calidad de HPLC.

15 **Ejemplo 2 - Digestiones independientes de tripsina y HNE**

Las muestras se desnaturizaron y redujeron añadiendo 57,1 μ l de tampón desnaturizante y 2 μ l de solución reductora a 42,9 μ l de muestra (1-2 mg/ml en tampón de formulación) seguido de incubación a 37 °C durante 35 min. Después de la reducción, se añadieron 9 μ l de solución de alquilación a cada muestra, seguido de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. La alquilación de detuvo mediante la adición de 7 μ l de solución reductora. Las muestras se desalaron con columnas de desalación con giro Zeba (Thermo Scientific, Waltham, MA, PIN 89883) de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando una centrífuga Eppendorf 5430 (Hamburgo, Alemania) con giros a 1500 xg. La concentración de la muestra se midió después de la desalación usando un Implen NanoPhotometer Pearl (Múnich, Alemania) o un Thermo Scientific Nanodrop 2000c (Waltham, MA). La solución enzimática (tripsina o HNE) se añadió a cada muestra a una relación de enzima:sustrato de 1:20. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 35 min. La digestión se detuvo mediante la adición de 6 μ l de solución de inactivación de digestión.

30 **Ejemplo 3 - Digestiones secuenciales de tripsina y HNE**

Las muestras se desnaturizaron y redujeron añadiendo 57,1 μ l de tampón desnaturizante y 2 μ l de solución reductora a 42,9 μ l de muestra (1-2 mg/ml en tampón de formulación) seguido de incubación a 37 °C durante 35 min. Después de la reducción, se añadieron 9 μ l de solución de alquilación a cada muestra, seguido de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. La alquilación de detuvo mediante la adición de 7 μ l de solución reductora. Las muestras se desalaron con columnas de desalación con giro Zeba (Thermo Scientific, Waltham, MA, PIN 89883) de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando una centrífuga Eppendorf 5430 (Hamburgo, Alemania) con giros a 1500 xg. La concentración de la muestra se midió después de la desalación usando un Implen NanoPhotometer Pearl (Múnich, Alemania) o un Thermo Scientific Nanodrop 2000c (Waltham, MA). Se añadió solución de tripsina a cada muestra a una relación de enzima:sustrato de 1:20. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 35 min. Se añadió la solución de HNE a cada muestra a una relación de enzima:sustrato de 1:20. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 30 min. La digestión se detuvo mediante la adición de 6 μ l de solución de inactivación de digestión.

45 **Ejemplo 4 - Mezcla de digestión con tripsina y digestión secuencia con tripsina-HNE**

Las muestras se desnaturizaron y redujeron añadiendo 57,1 μ l de tampón desnaturizante y 2 μ l de solución reductora a 42,9 μ l de muestra (1 mg/ml en tampón de formulación) seguido de incubación a 37 °C durante 35 min. Después de la reducción, se añadieron 9 μ l de solución de alquilación a cada muestra, seguido de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. La alquilación de detuvo mediante la adición de 7 μ l de solución reductora. Las muestras se desalaron con columnas de desalación Zeba de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando una centrífuga Eppendorf 5430 con giros a 1500 xg. La concentración de la muestra se midió después de la desalación usando un NanoPhotometer Pearl o un Nanodrop 2000c. Se añadió solución de tripsina a cada muestra a una relación de enzima:sustrato de 1:20. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 35 min. Después de la digestión con tripsina, cada muestra se dividió en dos alícuotas iguales (~55 μ l cada una). Se añadieron 3 μ l de solución de inactivación de digestión a la primera alícuota, que entonces se dejó a un lado. A la segunda alícuota, se le añadió solución de HNE a una relación de enzima:sustrato de 1:20. Esta alícuota se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 30 min seguido de la adición de 3 μ l de solución de inactivación de digestión. Las dos alícuotas entonces se combinaron a una relación de 1:1 seguido de mezcla suave.

60 **Ejemplo 5 - Preparación de reactivos para los ejemplos 6 y 7**

El tampón desnaturizante (guanidina HCl 6 M, tris 200 mM, metionina 20 mM, pH 8,3) se preparó añadiendo 20 ml de clorhidrato de (hidroximetil)aminometano (tris) 1 M, pH 8,3 (Teknova, St. Louis, MO, PIN T1083) a 87,5 ml de guanidina HCl 8 M (Pierce, Rockford, IL, PIN 24115) seguido de la adición de 299 mg de L-metionina (J.T. Baker, PIN 2085-05). El pH de la solución se ajustó hasta pH 8,3 con ácido clorhídrico (HCl) 1 N (Ricca, Arlington, TX, PIN R3700100-120A) o hidróxido de sodio (NaOH) 1 N (Merck, Kenilworth, NJ, PIN 1.09137.100). El volumen se ajustó

5 hasta 100 ml con agua de calidad de HPLC. La solución de reducción (DTT 500 mM) se preparó disolviendo 7,7 mg de ditioneitol (DTT) pesado previamente (Pierce, Rockford, IL, PIN 20291) en 100 µl de tampón desnaturante. La solución de alquilación (NaIAA 500 mM) se preparó disolviendo 15-65 mg de yodoacetato de sodio (NaIAA) (Sigma, St. Louis, MO, PIN I-9148) en un volumen de tampón desnaturante suficiente para producir NaIAA 500 mM. El
 10 tampón de digestión (tris 50 mM, metionina 20 mM, pH 7,8) se preparó disolviendo 299 mg de L-metionina en 10 ml de tris 1 M, pH 7,8 y añadiendo 100 ml de agua de calidad de HPLC. El pH de la solución se ajustó hasta pH 7,8 con ácido clorhídrico (HCl) 1 N (Ricca, Arlington, TX, PIN R3700100-120A) o hidróxido de sodio (NaOH) 1 N (Merck, Kenilworth, NJ, PIN 1.09137.100), y el volumen se ajustó hasta 100 ml con agua de calidad de HPLC. Las soluciones enzimáticas (1 mg/ml de tripsina, 1 mg/ml de HNE) se prepararon añadiendo 100 µl de tampón de digestión a 100 µg
 15 de tripsina (Roche, Basilea, Suiza, PIN 03708969001) o 100 µg de HNE (Elastin Products Company, Owensville, MO, PIN SE563). La solución de inactivación de digestión (guanidina HCl 8 M, acetato 250 mM, pH 4,7) se preparó disolviendo 76,4 g de guanidina HCl (Sigma, St. Louis, MO, PIN 50933) y 1,0 g de acetato de sodio (Sigma, PIN 32319) en 95 ml de agua de calidad de HPLC. Entonces se añadieron 716 µl de ácido acético glacial (Sigma, St. Louis, MO, PIN 320099), y el pH se ajustó hasta pH 4,7 con HCl o NaOH. Entonces el volumen se ajustó hasta 100 ml con agua de calidad de HPLC.

Ejemplo 6 - Digestión secuencial asistida por filtro de giro con PCPM

20 Se añadieron 100 µg de muestra en tampón de formulación a una unidad de giro con punto de corte de peso molecular de 30 kDa que consiste en una unidad de membrana colocada dentro de un tubo de centrífuga para recoger el filtrado. (Millipore, Billerica, MA, PIN MRCF0R030 o Pall, Port Washington, NY, PIN OD030C34). Esta unidad se centrifugó durante 15 min a 14 000 xg usando una centrífuga Eppendorf 5430. El filtrado se descartó. Se añadieron 200 µl de tampón desnaturante a la muestra, la unidad de filtro se centrifugó durante 15 min a 14 000 xg, y el filtrado se
 25 descartó; esto se repitió dos veces adicionales. Para cada muestra, se añadieron 3 µl de solución reductora a 37 µl de tampón desnaturante, y 40 µl de esta solución se añadieron a la unidad de filtro. Las muestras se desnaturaron y redujeron incubando a 37 °C en baño de agua durante 45 min. Las muestras entonces se centrifugaron durante 15 min a 14 000 xg, y el filtrado se descartó. Para cada muestra, se añadieron 7 µl de solución de alquilación a 33 µl de tampón desnaturante, y 40 µl de esta solución se añadieron a la unidad de filtro. Las muestras se alquilaron incubando a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. Las muestras entonces se centrifugaron durante 15 min a 14 000 xg, y el filtrado se descartó. Para cada muestra, se añadieron 4 µl de solución
 30 desnaturante a 36 µl de tampón desnaturante, y 40 µl de esta solución se añadieron a la unidad de filtro para detener la alquilación. Las muestras entonces se centrifugaron durante 15 min a 14 000 xg, y el filtrado se descartó. Se añadieron 200 µl de tampón de digestión a la muestra, la unidad de filtro se centrifugó durante 15 min a 14 000 xg, y el filtrado se descartó; esto se repitió dos veces adicionales para retirar los agentes desnaturante, reductor y alquilante. Para cada muestra, se añadieron 5 µl de solución de tripsina a 35 µl de tampón de digestión, y 40 µl de esta solución se añadieron a la unidad de filtro (relación 1:20 de enzima:sustrato). La muestra se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 60 min. La unidad de filtro se transfirió a un nuevo tubo de recogida (tubo de recogida 2). El tubo de recogida inicial (tubo de recogida 1) se dejó a un lado. La unidad de filtro se centrifugó durante 15 min a 14 000
 35 xg. El filtrado, que contenía péptidos tripticos, se retuvo en el tubo de recogida 2. Se añadieron 20 µl de tampón de digestión a la unidad de filtro, la unidad de filtro (en el tubo de recogida 2) se centrifugó durante 15 min a 14 000 xg, y el filtrado se retuvo en el tubo de recogida 2; esto se repitió una vez adicional. La unidad de filtro se transfirió de nuevo al tubo de recogida 1, y el tubo de recogida 2 se dejó a un lado. Para cada muestra, se añadieron 5 µl de solución de HNE a 35 µl de tampón de digestión, y 40 µl de esta solución se añadieron a la unidad de filtro (ahora en el tubo de recogida 1, relación 1:20 de enzima:sustrato en función del material de partida). La muestra se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 30 min. La unidad de filtro se transfirió al tubo de recogida 2. El tubo de recogida 1 se descartó. La unidad de filtro se centrifugó durante 15 min a 14 000 xg. El filtrado, que contenía péptidos resultantes de la digestión con HNE, se retuvo en el tubo de recogida 2 (junto con los péptidos tripticos de etapas previas). Se añadieron 20 µl de tampón de digestión a la unidad de filtro, la unidad de filtro (en el tubo de recogida 2) se centrifugó durante
 40 15 min a 14 000 xg, y el filtrado se retuvo en el tubo de recogida 2; esto se repitió una vez adicional. La digestión se detuvo mediante la adición de 160 µl de tampón de inactivación de digestión al tubo de recogida 2.

Ejemplo 7 - Digestión secuencial asistida por filtro de giro con PCPM, acertada

55 Se añadieron 200 µl de tampón desnaturante a una unidad de giro con punto de corte de peso molecular de 30 kDa que consiste en una unidad de membrana colocada dentro de un tubo de centrífuga para recoger el filtrado. (Millipore, Billerica, MA, PIN MRCF0R030 o Pall, Port Washington, NY, PIN OD030C34). Esta unidad se centrifugó durante 10 min a 14 000 xg usando una centrífuga Eppendorf 5430. El filtrado se descartó. Se añadieron 100 µg de muestra en tampón de formulación a la unidad de filtro y se centrifugó durante 10 min a 14 000 xg. El filtrado se
 60 descartó. Para cada muestra, se añadieron 3 µl de solución reductora a 37 µl de tampón desnaturante, y 40 µl de esta solución se añadieron a la unidad de filtro. Las muestras se desnaturaron y redujeron incubando a 37 °C en baño de agua durante 30 min. Para cada muestra, se añadieron 7 µl de solución de alquilación a 33 µl de tampón desnaturante, y 40 µl de esta solución se añadieron a la unidad de filtro. Las muestras se alquilaron incubando a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. Para cada muestra, se añadieron 4 µl de solución desnaturante a 36 µl de tampón desnaturante, y 40 µl de esta solución se añadieron a la unidad de filtro para detener la alquilación. Las muestras entonces se centrifugaron durante 15 min a 14 000 xg, y el filtrado se descartó. Se añadieron 200 µl de tampón de digestión a la muestra, la unidad de filtro se centrifugó durante 15 min a 14 000 xg,
 65

y el filtrado se descartó; esto se repitió dos veces adicionales para retirar los agentes desnaturante, reductor y alquilante. Para cada muestra, se añadieron 5 µl de solución de tripsina a 35 µl de tampón de digestión, y 40 µl de esta solución se añadieron a la unidad de filtro (relación 1:20 de enzima:sustrato). La muestra se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 60 min. La unidad de filtro se transfirió a un nuevo tubo de recogida (tubo de recogida 2). El tubo de recogida inicial (tubo de recogida 1) se dejó a un lado. La unidad de filtro se centrifugó durante 10 min a 14 000 xg. El filtrado, que contenía péptidos tripticos, se retuvo en el tubo de recogida 2. Se añadieron 20 µl de tampón de digestión a la unidad de filtro, la unidad de filtro (en el tubo de recogida 2) se centrifugó durante 10 min a 14 000 xg, y el filtrado se retuvo en el tubo de recogida 2; esto se repitió una vez adicional. La unidad de filtro se transfirió de nuevo al tubo de recogida 1, y el tubo de recogida 2 se dejó a un lado. Para cada muestra, se añadieron 5 µl de solución de HNE a 35 µl de tampón de digestión, y 40 µl de esta solución se añadieron a la unidad de filtro (ahora en el tubo de recogida 1, relación 1:20 de enzima:sustrato en función del material de partida). La muestra se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 30 min. La unidad de filtro se transfirió al tubo de recogida 2. El tubo de recogida 1 se descartó. La unidad de filtro se centrifugó durante 10 min a 14 000 xg. El filtrado, que contenía péptidos resultantes de la digestión con HNE, se retuvo en el tubo de recogida 2 (junto con los péptidos tripticos de etapas previas). Se añadieron 20 µl de tampón de digestión a la unidad de filtro, la unidad de filtro (en el tubo de recogida 2) se centrifugó durante 10 min a 14 000 xg, y el filtrado se retuvo en el tubo de recogida 2; esto se repitió una vez adicional. La digestión se detuvo mediante la adición de 160 µl de tampón de inactivación de digestión al tubo de recogida 2. En la tabla 9 se recoge una comparación que resalta las diferencias entre los protocolos 4 y 5.

20 **Ejemplo 8 - Condiciones de cromatografía de líquidos de ultrarrendimiento (UPLC)**

Para todas las muestras, la fase móvil A consistía en ácido fórmico al 0,1 % en agua, y la fase móvil B consistía en ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo. Para los experimentos iniciales usando los protocolos 1 y 2, los péptidos se separaron usando una columna de UPLC CSH C18 1,7 µm, 2,1 x 150 mm (Waters, Milford, MA, PIN 186005298). Después de la adquisición de los datos de transferencia, se realizaron los experimentos restantes usando los métodos de los ejemplos 2-4 con una columna de UPLC BEH C18 1,7 µm, 2,1 x 150 mm (Waters, Milford, MA, PIN 186003556). Las separaciones en UPLC se realizaron usando un sistema Thermo Scientific U-3000 (Waltham, MA), un sistema Waters Acquity H-Class (Milford, MA) o un sistema Agilent 1290 (Santa Clara, CA) utilizando gradientes resumidos en las tablas 1-3 (dependiendo del experimento). En función del material de partida, se cargaron ~3-4 µg de muestra en la columna.

30 **Ejemplo 9 - Condiciones de espectrometría de masas**

Los péptidos resultantes de la digestión se analizaron usando un Thermo Scientific Q Exactive (Waltham, MA), un Thermo Scientific Q Exactive Plus (Waltham, MA) o un Thermo Scientific Q Exactive BioPharma (Waltham, MA). Como se usaron múltiples instrumentos, los parámetros de recopilación de datos variaron ligeramente dependiendo del instrumento. Los instrumentos se hicieron funcionar en modo dependiente de datos (superior 4-8) sobre un intervalo de barrido de 200-2000 m/z. La diana AGC se estableció a 1E6 para barridos de MS1 y 5E5 para barridos de espectrometría de masas en tándem (MSMS). Los barridos de MS1 se recogieron a una resolución de 35 000 o 140 000, y los barridos de MS2 se recogieron a una resolución de 17 500. Se especificó una ventana de aislamiento de 2-4 m/z para barridos de MSMS. Se excluyeron picos con estados de carga sin asignar y estados de carga mayores de 8 de la MSMS. La exclusión dinámica se estableció a 10 s. Se permitió masa de bloqueo de m/z 391,28430.

45 **Ejemplo 10 - Análisis de datos**

Los datos de MS se buscaron con MassAnalyzer (los datos se recogieron durante varios meses, de modo que se usaron múltiples versiones de MassAnalyzer). La carboximetilación se especificó como una modificación estática. Dependiendo del experimento, la escisión se especificó como no específica o en el extremo C de aminoácidos KRITAL. Para todas las búsquedas, se estableció una relación de señal a ruido a 20, se especificó una precisión de masa de 15 ppm y se estableció una confianza a 0,95. Para mapas de cobertura de secuencia, el área de pico mínima se estableció a un 1 % del pico base, el umbral de área de pico relativa se estableció a un 17 %, la confianza mínima se estableció a 0,95, y la masa peptídica máxima se estableció a 15 000.

55 **Ejemplo 11 - Resultados**

Los experimentos iniciales que prueban la eficacia de HNE para la digestión de moléculas de BiTE[®] fueron comparaciones directas de digestión con tripsina respecto a digestión con HNE para BiTE[®]-3 usando el protocolo 1 y el gradiente 1. La digestión con tripsina no produjo péptidos que pudieran usarse para caracterizar atributos en alguna CDR. Por otro lado, la digestión con HNE produjo varios péptidos correspondientes a la región conectora. Muchos de estos péptidos se identificaron con baja intensidad de señal (<10⁶), y esta ausencia de especificidad (14 péptidos identificados) podría comprometer potencialmente la cuantificación de los atributos en esta región. Sin embargo, se creía que la especificidad de HNE está relacionada con la longitud del sustrato que se está digiriendo (Stein *et al.*, 1987). Esta propiedad de la enzima se aprovechó digiriendo en primer lugar BiTE[®]-3 con tripsina para producir posibles sustratos con longitudes más cortas de aminoácidos, seguida de digestión con HNE (protocolo 2). Esta digestión secuencial produjo un solo péptido con alta intensidad de señal (>1,5 × 10⁷).

Habiendo demostrado la idoneidad de la preparación de muestras utilizando digestión con tripsina-HNE para supervisar los atributos en las CDR de interés α -CD3, se prepararon moléculas adicionales (BiTE[®]-1, BiTE[®] con prolongación de semivida; BiTE[®]-2, BiTE[®] canónico; y CDH19, BiTE[®] con prolongación de semivida; además de BiTE[®]-3, BiTE[®] con prolongación de semivida) que se habían sometido a fotodegradación (1,2 millones de lux-h de luz blanca fría, t = 3 d) y desamidación forzada (pH 8,5, 50, t = 3 d) además de muestras no sometidas a agresión usando el protocolo 2 y el gradiente 1. Para muestras no sometidas a agresión, las coberturas de secuencia para CDR 1 α -CD3 fueron muy reproducibles (**figura 4**). Se identificaron de forma coherente uno o dos péptidos correspondientes a posibles sitios de desamidación de asparagina en esta CDR con alta intensidad de señal (>10⁷). Asimismo, para todas las moléculas excepto CDH19, se identificó un solo péptido correspondiente a un posible sitio de oxidación de triptófano con alta intensidad de señal. Las condiciones de desamidación forzada produjeron tres picos correspondientes a desamidación en la CDR 1 α -CD3 para las cuatro moléculas que no se observaron en las muestras no sometidas a agresión (**figura 3** ilustra BiTE[®]-1 como ejemplo representativo). La MSMS (**figura 4**) confirmó que los dos picos que eluyen en primer lugar correspondían ambos a desamidación de motivo -GNS- mientras que el pico que eluye último correspondía a desamidación de motivo -GNF-. Una comparación de los porcentajes de modificación para las cuatro moléculas (tabla 11.1) resalta que ambos sitios de desamidación posibles en esta CDR eran susceptibles de modificación y deben supervisarse. También se observó oxidación de triptófano de CDR seguida de fotodegradación a porcentajes significativamente menores (tabla 11.2). No se observó desamidación aumentada para la segunda CDR en cercana proximidad al péptido conector grande (α -CD3 CDR2). Estos resultados iniciales establecieron que no solamente son sitios inestables presentes en las CDR α -CD3 que no pueden supervisarse usando digestión con tripsina, sino también que la digestión secuencial con tripsina-HNE puede usarse para identificar y supervisar estas modificaciones.

Tabla 11.1

Cuantificación de desamidación de asparagina observada para múltiples moléculas de BiTE [®]		
Molécula	Sin agresión	Desamidación forzada*
BiTE [®] -1	1,0%	39,6%
BiTE [®] -3	1,8%	39,8%
BiTE [®] -2	1,8%	5,7%
CDH19	1,0%	42,4%

*Las condiciones de agresión fueron pH 8,5, 50 °C durante 3 d. Los niveles de desamidación explican las áreas de pico de las tres especies desamidadas con respecto al área de pico sin modificar.

Tabla 11.2

Cuantificación de oxidación de triptófano observada para múltiples moléculas de BiTE [®]				
Molécula	Oxidación de triptófano de CDR*		Oxidación de triptófano no de CDR*	
	Sin agresión	Fotodegradación [^]	Sin agresión	Fotodegradación [^]
BiTE [®] -1	0,1 %	1,9 %	0,1 %	1,0 %
BiTE [®] -3	0,4 %	2,9 %	0,0 %	0,6 %
BiTE [®] -2	0,3 %	1,2 %	0,3 %	0,5 %
CDH19	0,1 %	0,9 %	0,2 %	0,3 %

*Los niveles de oxidación justifican las áreas de pico de oxidación y quinurenina con respecto al área de pico sin modificar.

[^]Las condiciones de agresión fueron 1,2 millones de lux-h de luz blanca fría durante 3 d.

Aunque la digestión con tripsina-HNE produjo péptidos de alta calidad para las dos CDR α -CD3 de interés, la cobertura de secuencia y la cuantificación de modificaciones para el resto de la molécula aún requería los péptidos tripticos utilizados por MAM convencional.

Se realizó un solo análisis en una mezcla 1:1 de muestra digerida con tripsina combinada con una alícuota de muestra digerida con tripsina seguida de HNE (**figura 5**). Una ventaja adicional de esta estrategia de analizar una mezcla de dos digestiones depende del hecho de que los datos para lo que es esencialmente dos mapas peptídicos se adquieren en una sola inyección; no solamente esto permite una mayor cobertura de secuencia identificada, sino que, en el caso de BiTE[®]-2, un péptido que contiene un atributo crucial (isomerización de ácido aspártico de CDR) resultante de digestión con tripsina-HNE producía mejor calidad de señal y reproducibilidad que el péptido triptico correspondiente. Además, el gradiente de UPLC utilizado para la separación se cambió a gradiente 2, y la columna se cambió de la columna Waters CSH C18 a la columna Waters BEH C18. La robustez de esta estrategia se evaluó analizando

muestras no sometidas a agresión, muestras de fotodegradación, muestras de salto de pH y muestras de degradación térmica correspondientes a dos moléculas (BiTE[®]-2 y BiTE[®]-3). Se prepararon muestras de digestión con tripsina, digestión secuencial con tripsina-HNE y una mezcla 1:1 de digestión con tripsina y digestión con tripsina-HNE por dos analistas y se analizaron usando dos sistemas de UPLC (Thermo U-3000 y Waters Acquity H-Class) conectados a dos espectrómetros de masas diferentes (Thermo QExactivo y Thermo QExactivo Plus) (**figura 8**). Todas las muestras se prepararon por duplicado, de modo que se adquirió un total de cuatro inyecciones para cada condición.

La tabla 11.3 recopila los resultados de cuantificación de la desamidación de CDR 1 α -CD3 tanto de BiTE[®]-2 como de BiTE[®]-3 como un péptido representativo con desamidación de asparagina. Para los datos presentados en esta tabla, se realizó fotodegradación con 192 000 lux-h durante 2 d; la degradación por salto de pH se realizó a pH 8,4 a 37 °C durante 7 d; y la degradación térmica se realizó a 40 °C durante 4 semanas. Estos resultados indican que mezclar la digestión con tripsina con la digestión con tripsina-HNE tenía impacto mínimo sobre los resultados de cuantificación. Reducir el gradiente aún provocaba una clara separación de las tres especies de desamidación (sin modificar separadas del pico 1 de -GNS- en ~1,5 min, pico 1 de -GNS- separado del pico 2 de -GNS- en ~0,5 min, pico 2 de -GNS- separado de -GNF- en ~1,3 min, datos no mostrados). Además, la precisión de los niveles de desamidación para ambas moléculas fue comparable independientemente de si la digestión con tripsina-HNE se ejecutaba por separado o mezclada con la digestión con tripsina. Como la desamidación y la isomerización de ácido aspártico eran típicamente las modificaciones más problemáticas para separar cromatográficamente de los péptidos sin modificar correspondientes, la tabla 11.4 recopila los resultados de cuantificación para isomerización de BiTE[®]-3 D⁵¹⁰ como un péptido representativo con isomerización de ácido aspártico. Para los datos presentados en esta tabla, se realizó fotodegradación con 192 000 lux-h durante 2 d; la degradación por salto de pH se realizó a pH 8,4 a 37 °C durante 7 d; y la degradación térmica se realizó a 40 °C durante 4 semanas. A pesar de contener residuos de treonina y leucina, una parte de la secuencia de BiTE[®]-3 experimenta escisión mínima durante digestión secuencial con HNE, de modo que fue posible cuantificar la isomerización D⁵¹⁰ usando un péptido completamente tríptico independientemente de si se analizaba la digestión con tripsina, la digestión secuencial con tripsina-HNE o la mezcla 1:1 de las dos digestiones. En estos resultados, los niveles de isomerización D⁵¹⁰ fueron coherentes independientemente de las condiciones de digestión, de nuevo reforzando la observación de que mezclar estas digestiones tenía impacto mínimo sobre la cuantificación de atributos. Estos resultados demuestran que mezclar las dos digestiones paralelas es una estrategia razonable para moléculas de BiTE[®] (así como otros polipéptidos) y que hacerlo tiene impacto mínimo sobre la cuantificación de modificaciones independientemente de si se usan péptidos trípticos o péptidos sometidos a tripsina-HNE.

Tabla 11.3

Cuantificación de desamidación de asparagina de BiTE [®] -2 y BiTE [®] -3			
Condición	Digestión	BiTE [®] -2 N ³⁶⁰ +N ³⁶³	BiTE [®] -3 N ³⁵⁹ +N ³⁶²
		Desamidación**	Desamidación**
Control	Tripsina → elastasa de neutrófilos* mezcla [^]	1,9% ± 0,2%	1,9% ± 0,1%
		2,2% ± 0,6%	1,6% ± 0,3%
Fotodegradación	Tripsina → elastasa de neutrófilos* mezcla [^]	2,1% ± 0,4%	2,0% ± 0,3%
		2,2% ± 0,7%	1,8% ± 0,2%
Degradación por salto de pH	Tripsina → elastasa de neutrófilos* mezcla [^]	54,7% ± 0,3%	42,2% ± 1,1%
		54,5% ± 1,0%	41,5% ± 1,2%
Degradación térmica	Tripsina → elastasa de neutrófilos mezcla	13,5% ± 0,4%	4,9% ± 0,3%
		13,6% ± 0,8%	4,5% ± 0,3%

*"Tripsina → elastasa de neutrófilos" corresponde a BiTE[®]-2/BiTE[®]-3 digerido con tripsina seguido de digestión secuencial con elastasa de neutrófilos.

[^]"Mezcla" corresponde a tripsina → elastasa de neutrófilos" mezclada (1:1) con BiTE[®]-2/ BiTE[®]-3 digerido con tripsina.

**Los niveles de desamidación son totales y justifican las áreas de pico de las tres especies desamidadas (-GNS- y -GNF-) con respecto al área de pico sin modificar.

Tabla 11.4

Cuantificación de isomerización de ácido aspártico de BiTE®-3		
Condición	Digestión	Isomerización D ⁵¹⁰
Control	Tripsina*	0,2% ± 0,1%
	Tripsina → elastasa de neutrófilos"	0,4% ± 0,1%
	Mezcla**	0,3% ± 0,1%
Fotodegradación	Tripsina*	0,3% ± 0,1%
	Tripsina → elastasa de neutrófilos"	0,4% ± 0,1%
	Mezcla**	0,3% ± 0,1%
Degradación por salto de pH	Tripsina*	0,8% ± 0,1%
	Tripsina → elastasa de neutrófilos"	1,0% ± 0,2%
	Mezcla**	1,0% ± 0,2%
Degradación térmica	Tripsina*	4,1% ± 0,4%
	Tripsina → elastasa de neutrófilos"	4,1% ± 0,4%
	Mezcla**	3,9% ± 0,5%

*"Tripsina" indica BiTE®-3 digerido con tripsina.

^"Tripsina → elastasa de neutrófilos" corresponde a BiTE®-2/BiTE®-3 digerido con tripsina seguido de digestión secuencial con elastasa de neutrófilos.

**"Mezcla" corresponde a tripsina → elastasa de neutrófilos" mezclada (1:1) con BiTE®-2/ BiTE®-3 digerido con tripsina

El MAM utilizando el método descrito anteriormente (protocolo 3, gradiente 2) estaba habilitado para BiTE®-2 (ATM-000401) y BiTE®-3 (ATM-000391). Sin embargo, durante el análisis, el procedimiento de detección de nuevos picos (tamiz) incorporado en el método identificó varios picos nuevos. Esto produjo un fallo en la idoneidad del sistema de las secuencias. Después de evaluación adicional, varios de los picos correspondían a escisiones trípticas perdidas. Sin embargo, algunos de estos picos se observaron en la inyección final de idoneidad del sistema (pero no en la inyección inicial previa a la ejecución). Estos hallazgos sugirieron que la eficacia de la tripsina estaba algo obstaculizada, pero también sugirieron que una de las enzimas aún era activa a pesar de la acidificación de la muestra después de digestión. Sin embargo, la cuantificación de atributos no se vio afectada por los nuevos picos (solamente las comprobaciones de idoneidad del sistema). La localización de problemas indicó que las columnas de desalación utilizadas en los protocolos 1-3 no estaban eliminando completamente la guanidina de la muestra antes de la digestión. La eficacia de tripsina puede inhibirse por niveles bajos de guanidina, de modo que era probable que la eliminación variable de guanidina por la columna de desalación provocara digestión de tripsina incoherente. Además, como se ha informado de inactivación ácida de la digestión con tripsina, se especuló que la acidificación no estaba inactivando suficientemente la digestión con HNE. La actividad enzimática, aunque se reducía debido a acidificación, provocaría la observación de nuevos picos si se realizaba una inyección replicada desde un solo vial después de un periodo de tiempo; esto, a su vez, provocaría un fallo de la evaluación de la idoneidad del sistema.

Para abordar estas cuestiones, se realizó una exploración minuciosa de múltiples métodos de preparación. Estos incluyeron evaluar múltiples columnas de desalación (Zeba, Biospin, NAP-5), métodos de preparación que no requieren guanidina para la desnaturalización (Rapigest), y métodos pasados en filtro con PCPM usando múltiples fabricantes (Pall y Microcon® (disponible en Millipore (Waltham, MA)), así como múltiples puntos de corte de peso molecular (30 kDa, 5 kDa, como se especifica por los fabricantes). Además, el tampón de inactivación de digestión se actualizó para que incluyera una alta concentración de guanidina para inactivar ambas enzimas. En los protocolos 1-3, la inactivación ácida típicamente provocó un pH final de la muestra de ~2. El tampón de inactivación de digestión actualizado era suficientemente bajo para inhibir las actividades de tripsina y HNE, pero suficientemente alto para minimizar las modificaciones por artefactos (por ejemplo, desamidación e isomerización) que pueden resultar debido a exposición prolongada a bajo pH. Como esta tampón de inactivación contenía guanidina, la etapa de lavado inicial en el gradiente de UPLC se prolongó; todos los experimentos que utilizan el tampón de inactivación con guanidina requerían el uso del gradiente 3 para desalar minuciosamente las muestras antes del análisis de MS.

La conclusión de esta investigación fue que un método basado en filtro con PCPM (protocolo 4 anterior, adaptado del método de preparación de muestras asistido por filtro (FASP) presentado previamente (Wisniewski *et al.*, 2009)) superaba a otros métodos de preparación basados en varios parámetros (por ejemplo, repetibilidad, recuperación, cuantificación, cobertura de secuencia, intervalo de concentración, *etc.*). Se presenta un esquema del protocolo 4 en

la **figura 7**. En este método, la molécula se captura en la parte superior de un filtro de giro de 30 kDa de PCPM, y la desnaturalización, reducción, alquilación, desalación y digestión pueden producirse todas en el filtro. Después de la digestión, los péptidos resultantes se recogen a través de centrifugación. En la digestión secuencial resumida en el protocolo 4, después de la digestión con tripsina, se recogen los péptidos tripticos, y las especies que no pasan a través del filtro se someten entonces a digestión con HNE. Una de las sorprendentes observaciones de este método es que el péptido conector de 8 kDa de interés se retenía por el filtro de 30 kDa, a pesar de las recomendaciones hechas por los fabricantes Microcon® y Pall, respectivamente, de "usar una membrana con un PCPM al menos dos veces más pequeño que el peso molecular del soluto proteínico que se pretende concentrar" y "seleccionar un PCPM que sea de tres a seis veces más pequeño que el peso molecular del soluto que se retiene". Aunque los fabricantes recomiendan usar un PCPM de dos a seis veces más pequeño que la especie que es la diana para la retención, sorprendentemente, el péptido de 8 kDa se está reteniendo por un PCPM casi cuatro veces mayor que el propio péptido.

La retención del péptido de 8 kDa por filtros de 30 kDa de PCPM con membranas que consisten en diferentes materiales (las membranas Microcon® son de celulosa regenerada, las membranas Pall son de polietersulfona modificada) enfatiza que esto no es un artefacto específico del fabricante. No solamente este uso novedoso de un filtro de PCPM hace posible una digestión secuencial, sino que una comparación directa de este método que utiliza el filtro de 30 kDa de PCPM con un método diferente usando un filtro de 5 kDa de PCPM mostró que el método con filtro de 30 kDa superaba significativamente al método con filtro de 5 kDa en términos de eficacia de digestión con tripsina, repetibilidad, precisión de la cuantificación de atributos y recuperación. La ventaja principal de este método es que la especificidad de la enzima producida por la digestión con tripsina se conserva para el grueso de la molécula, y solamente los péptidos grandes difíciles de caracterizar por MS se digieren adicionalmente en péptidos más pequeños porque se retienen en el filtro. Esto se ilustra por la **figura 8**, que resalta la especificidad de péptidos de la tripsina identificados para BiTE®-1, BiTE®-2 y BiTE®-3 (análisis triplicado para cada molécula) usando filtros fabricados tanto por Microcon® como por Pall. En estos resultados, más de un 95 % de los péptidos identificados típicamente correspondían a digestión con tripsina, mientras los péptidos identificados restantes correspondían principalmente al péptido conector de 8 kDa grande interés (**figura 9**). La cuantificación de atributos para BiTE®-2 usando filtros de ambos fabricantes fue comparable a los resultados para la digestión paralela (protocolo 3) (tabla 11.5). También se observaron resultados similares para BiTE®-1 y BiTE®-3. Este método resolvió el problema de nuevos picos al eliminar la guanidina más completamente en comparación con el otro método analizado anteriormente, y las enzimas también se inactivaban por el tampón de inactivación actualizado o por retención en el filtro de PCPM. En la **figura 10**, una muestra de BiTE®-3 preparada usando el protocolo 3 se reinyectó después de ~4 d. Estaban presentes solamente varios picos en la inyección inicial, que estaban ausentes en la segunda inyección. En contraste, las muestras preparadas usando el protocolo 4 eran coherentes incluso después de haber pasado 4 d entre inyecciones (**figura 11**). Estos resultados sugieren que la preparación basada en filtro de PCPM resumida en el protocolo 4 es robusta, produce resultados de cuantificación coherentes con los presentados previamente, y elimina muchas de las causas fundamentales de los nuevos picos observados con el protocolo 3.

Tabla 11.5

<u>Comparación de la cuantificación de atributos para BiTE®-2 usando filtros de 30 kDa de PCPM fabricados por Microcon® y Pall*</u>			
Atributo	Protocolo de referencia	Microcon® 30 kDa	Pall 30 kDa
Oxidación M ²³³	0,254% ± 0,046%	0,14% ± 0,02%	0,22% ± 0,03%
Isomerización D ⁵⁴ +D ⁵⁷ +D ⁶² [^]	1,256% ± 0,298%	1,01% ± 0,04%	0,89% ± 0,00%
Desamidación N ³⁶³	0,946% ± 0,375%	0,96% ± 0,02%	0,88% ± 0,02%

*La preparación con Microcon® se realizó por triplicado, pero debido al fallo del instrumento, solamente se analizaron dos preparaciones para los filtros de Pall.

[^]La isomerización D⁵⁴+D⁵⁷+D⁶² se cuantificó usando I⁵¹-R⁶⁵ para el protocolo de referencia. Se usó C⁴⁴-R⁶⁵ para la cuantificación en experimentos basados en filtro debido a la digestión con tripsina más eficaz.

Una de las preocupaciones principales sobre el protocolo 4 era la cantidad de tiempo necesario para preparar las muestras; una digestión secuencial utilizando el protocolo 4 podría llevar más de 8 h. Además de la fatiga del analista y otros factores, la cantidad de tiempo necesario para preparar las muestras usando este método podría introducir modificaciones por artefactos resultantes de la exposición prolongada a condiciones ambientales de laboratorio. Para abordar estas preocupaciones, se desarrolló una preparación acortada basada en filtro (protocolo 5). La tabla 11.6 resalta las diferencias entre los protocolos 4 y 5. El grueso del ahorro de tiempo introducido por el protocolo 5 se hizo posible eliminando las etapas superfluas de centrifugación, reduciendo los tiempos de centrifugación y reduciendo los tiempos de incubación. Estas reducciones teóricamente producen casi 2 h de ahorro de tiempo, pero en la práctica, los ahorros de tiempo eran típicamente mayores de 3 h. Aunque aún es ligeramente más largo que los métodos de preparación basados en solución, tales como el protocolo 3, estas modificaciones redujeron el tiempo de preparación de muestras hasta un punto donde es comparable con los métodos basados en solución.

Tabla 11.6

Comparación de los protocolos 4 y 5					
Protocolo 4			Protocolo 5		
Etapa	Descripción	Tiempo (min)	Etapa	Descripción	Tiempo (min)
-	-	-	1	Equilibrar el filtro con tampón desnaturalizante. Centrifugar	10
1	Centrifugar (retirar tampón de formulación)	15	2	Centrifugar (retirar tampón de formulación)	10
2	Añadir tampón desnaturalizante, centrifugar	15	-	-	-
3	Añadir tampón desnaturalizante, centrifugar	15	-	-	-
4	Añadir solución desnaturalizante/reductora. Incubar	45	3	Añadir solución desnaturalizante/reductora. Incubar	30
5	Centrifugar	15	-	-	-
6	Añadir solución de alquilación. Incubar	20	4	Añadir solución de alquilación. Incubar	20
7	Centrifugar	15	-	-	-
8	Añadir solución reductora. Centrifugar	15	5	Añadir solución reductora. Centrifugar	15
9	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	15	6	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	15
10	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	15	7	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	15
11	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	15	8	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	15
12	Añadir solución de tripsina. Incubar	60	9	Añadir solución de tripsina. Incubar	60
13	Centrifugar	15	10	Centrifugar	10
14	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	15	11	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	10
15	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	15	12	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	10
16	Añadir solución de HNE. Incubar	30	13	Añadir solución de HNE. Incubar	30
17	Centrifugar	15	14	Centrifugar	10
18	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	15	15	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	10
19	Añadir tampón de digestión. Centrifugar	15	-	-	-
	Tiempo total	380		Tiempo total	270
	Etapas de centrifugación	15		Etapas de centrifugación	9

5 Se presentan superposiciones que comparan las muestras BiTE®-2 preparadas con los protocolos 4 y 5 en la **figura 12** (cada preparación realizada por triplicado). Las únicas diferencias de picos destacables observadas fueron un saliente a ~24 min y un pico a ~47 min que estaban presentes en todas las muestras preparadas con el protocolo 4,

pero ninguna de las muestras preparadas con el protocolo 5. Estos picos se atribuyeron a carboximetilación no específica resultante de sobrealquilación. Asimismo, como el tiempo de incubación para la desnaturalización/reducción se redujo y las etapas de centrifugación entre la reducción y la alquilación se eliminaron, se compararon los niveles de alquilación para todos los residuos de cisteína (tabla 11.7). Para los datos en esta tabla, se determinaron los porcentajes de alquilación buscando datos con MassAnalyzer, especificando la carboximetilación como una modificación variable (en lugar de una modificación estática, que se especifica típicamente). Los niveles de alquilación para todas las muestras de BiTE[®]-1, independientemente de si las muestras se preparaban con el protocolo 4 o 5, estuvieron por encima de un 99,7 %. Se observaron resultados similares para BiTE[®]-2 y BiTE[®]-3, lo que sugiere que las reducciones de tiempo introducidas por el protocolo 5 no tenían impacto negativo sobre los niveles de alquilación. La cuantificación de atributos fue comparable cuando las muestras se preparaban con ambos protocolos 4 y 5, lo que a su vez era coherente con los niveles de modificación observados históricamente (tabla 11.8). Para los datos en esta tabla, cada preparación se realizó por triplicado. La isomerización D⁵⁴+D⁵⁷+D⁶² se cuantificó usando I⁵¹-R⁶⁵ para MDR-001581. Se usó C⁴⁴-R⁶⁵ para la cuantificación en experimentos basados en filtro debido a la digestión con tripsina más eficaz. Estos resultados iniciales para el protocolo 5 fueron alentadores, de modo que se realizó una evaluación de robustez limitada (dos analistas, muestras de BiTE[®]-2 preparadas por triplicado). La detección de nuevos picos fue adecuada para todas las muestras (por ejemplo, no se detectaron nuevos picos), y la cuantificación de atributos para las 6 inyecciones fue coherente con MDR-001581 (tabla 11.9). En función de estos resultados, junto con la comparación de otros parámetros tales como especificidad de tripsina, área identificada total, recuperación del péptido conector de 8 kDa y porcentaje de área identificada correspondiente a enzimas usadas para digestión, el protocolo 5 introduce ahorros de tiempo significativos al tiempo de preparación sin impacto negativo significativo sobre la calidad de los datos.

Tabla 11.7

Comparación de los niveles de alquilación de BiTE [®] -1 resultantes de los protocolos 4 y 5						
Residuo de Cys	Protocolo 4			Protocolo 5		
	Prep 1	Prep 2	Prep 3	Prep 1	Prep 2	Prep 3
C22	99,95%	99,97%	99,96%	100,00%	100,00%	100,00%
C44	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
C96	99,93%	99,95%	99,94%	99,99%	99,99%	99,99%
C162	99,93%	99,94%	99,95%	99,97%	99,98%	99,98%
C232	99,75%	99,73%	99,79%	99,94%	99,93%	99,94%
C244	99,95%	99,95%	99,96%	99,98%	99,98%	99,99%
C279	99,96%	99,97%	99,97%	99,99%	99,99%	100,00%
C355	99,92%	99,93%	99,94%	99,99%	99,98%	99,98%
C419	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
C487	99,98%	99,99%	99,99%	100,00%	100,00%	100,00%

Tabla 11.8

Comparación de cuantificación de atributos para AMG596 usando los protocolos 4 y 5			
Atributo	Protocolo de referencia	Protocolo 4	Protocolo 5
Oxidación M ²³³	0,254% ± 0,046%	0,14% ± 0,02%	0,13% ± 0,01%
Isomerización D ⁵⁴ +D ⁵⁷ +D ⁶²	1,256% ± 0,298%	1,01% ± 0,04%	0,89% ± 0,02%
Desamidación N ³⁶³	0,946% ± 0,375%	0,96% ± 0,02%	0,75% ± 0,04%

REFERENCIAS

- Crimmins, D.L., S.M. Mische, y N.D. Denslow. 2001. Chemical Cleavage of Proteins in Solution. In Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc.
- Doucet, A., y C.M. Overall. 2011. Broad coverage identification of multiple proteolytic cleavage site sequences in complex high molecular weight proteins using quantitative proteomics as a complement to edman sequencing. Molecular & cellular proteomics: MCP. 10:M110 003533.
- Gunzler, H., y A. Williams. 2001. Handbook of analytical techniques. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania. 1198 pp.

- Janoff, A., y J. Scherer. 1968. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 128:1137-1155.
- 5 Kurien, B.T., y R.H. Scofield. 2012. *Protein electrophoresis: methods and protocols.* Humana Press; Springer, Nueva York. xiv, 648 p. pp.
- Li, A., R.C. Sowder, L.E. Henderson, S.P. Moore, D.J. Garfinkel, y R.J. Fisher. 2001. Chemical Cleavage at Aspartyl Residues for Protein Identification. *Analytical Chemistry.* 73:5395-5402.
- 10 Lord, G.A. 2004. *Capillary electrophoresis of proteins and peptides*, editado por M. A. Strege y A. L. Lagu (Methods in Molecular Biology, volumen 276, editor de serie J. M. Walker). Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, 2004, 332 pp, US\$125.00. *Biomedical Chromatography.* 18:875-875.
- 15 Nowicka-Jankowska, T. 1986. *Analytical visible and ultraviolet spectrometry.* Elsevier; Distributors for the United States and Canada, Elsevier Science Pub. Co., Amsterdam; Nueva York NuevaYork, NY, EE. UU. xvi, 690 p. pp.
- 20 Pontius, J., L. Wagner, y G. Schuler. 2003. UniGene: a unified view of the transcriptome. In *The NCBI Handbook.* National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD).
- 25 Rawlings, N.D., M. Waller, A.J. Barrett, y A. Bateman. 2014. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research.* 42:D503-509.
- Rohani, R., M. Hyland, y D. Patterson. 2011. A refined one-filtration method for aqueous based nanofiltration and ultrafiltration membrane molecular weight cut-off determination using polyethylene glycols. *Journal of Membrane Science.* 382:278-290.
- 30 Rubakhin, S.S., y J.V. Sweedler. 2010. *Mass spectrometry imaging: principles and protocols.* Humana Press, Nueva York. xiv, 487 p. pp.
- 35 Sinha, S., W. Watorek, S. Karr, J. Giles, W. Bode, y J. Travis. 1987. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:2228-2232.
- Stein, R.L., A.M. Strimpler, H. Hori, y J.C. Powers. 1987. Catalysis by human leukocyte elastase: mechanistic insights into specificity requirements. *Biochemistry.* 26:1301-1305.
- 40 Tanabe, K., A. Taniguchi, T. Matsumoto, K. Oisaki, Y. Sohma, y M. Kanai. 2014. Asparagine-selective cleavage of peptide bonds through hypervalent iodine-mediated Hofmann rearrangement in neutral aqueous solution. *Chemical Science.* 5:2747-2753.
- 45 Tanford, C. 1968. Protein Denaturation. In *Advances in Protein Chemistry.* Vol. 23. C.B. Anfinsen, M.L. Anson, J.T. Edsall, y F.M. Richards, editores. Academic Press. 121-282.
- The UniProt, C. 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research.* 45:D158-D169.
- 50 Sin especificar. 2007. Tabla 2. Lista de proteasas habitualmente usadas para fragmentar proteínas. *Cold Spring Harbor Protocols.* 2007:pdb.tab2ip13.
- Wisniewski, J.R., A. Zougman, N. Nagaraj, y M. Mann. 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods.* 6:359-362.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de un polipéptido para análisis, que comprende:
 5 a. escindir el polipéptido en una muestra en una primera digestión, en donde la escisión produce al menos dos fragmentos del polipéptido,
 b. escindir los al menos dos fragmentos del polipéptido con elastasa de neutrófilos; y
 c. analizar la muestra después de escindir los al menos dos fragmentos del polipéptido con la elastasa de neutrófilos.
2. Un método de preparación de un polipéptido para análisis, que comprende:
 10 a. escindir el polipéptido en una muestra en una primera digestión; donde la escisión produce al menos dos fragmentos del polipéptido;
 b. dividir la muestra que comprende los al menos dos fragmentos del polipéptido en una primera alícuota y una segunda alícuota;
 15 c. digerir los al menos dos fragmentos de la primera alícuota con elastasa de neutrófilos; y
 d. analizar la primera alícuota y la segunda alícuota.
3. El método de la reivindicación 2, en donde después de digerir los al menos dos fragmentos del polipéptido con la elastasa de neutrófilos, se combinan la primera y segunda alícuota.
- 20 4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la escisión del polipéptido en la primera digestión comprende escisión proteolítica o química.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la escisión es escisión proteolítica conseguida por una proteasa, en donde la proteasa tiene una actividad diferente de la elastasa de neutrófilos, opcionalmente en donde la proteasa se
 25 selecciona del grupo que consiste en tripsina, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Arg-C, pepsina, quimotripsina, quimotripsina B, Lys-N proteasa, Lys-C proteasa, Glu-C proteasa, Asp-N proteasa, pancreatopeptidasa, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, proteinasa K y termolisina, y combinaciones de las mismas.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la proteasa es tripsina.
- 30 7. El método de la reivindicación 4, en donde la escisión es escisión química conseguida por un compuesto químico, opcionalmente en donde el compuesto químico se selecciona del grupo que consiste en bromuro de cianógeno, 2-nitro-5-tiocianobenzoato, hidroxilamina y BNPS-escatol, y combinaciones de los mismos.
- 35 8. El método de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además aplicar la muestra a un filtro que tiene un punto de corte de peso molecular antes de dicha primera digestión, en donde dicha primera digestión digiere la muestra en el filtro.
9. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el polipéptido se desnaturaliza antes de escindir el polipéptido en la muestra en la primera digestión.
- 40 10. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el polipéptido se alquila antes de escindir el polipéptido en la muestra en la primera digestión.
- 45 11. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde
 a. el polipéptido se desnaturaliza y se alquila o reducir antes de escindir el polipéptido en la muestra en la primera digestión, o
 b. el polipéptido se desnaturaliza, se reduce y alquila antes de escindir el polipéptido en la muestra en la primera
 50 digestión.
12. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la elastasa de neutrófilos es elastasa de neutrófilos humana (EC 3.4.21.37).
- 55 13. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el análisis comprende al menos una técnica seleccionada del grupo que consiste en cromatografía, electroforesis, espectrometría y combinaciones de las mismas.
14. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el polipéptido es un polipéptido terapéutico, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y un polipéptido de fusión.
- 60 15. El método de la reivindicación 14, en donde el polipéptido terapéutico es una molécula de acoplador de linfocitos T biespecífico.

FIG. 1

Dominio α -CD3 conservado

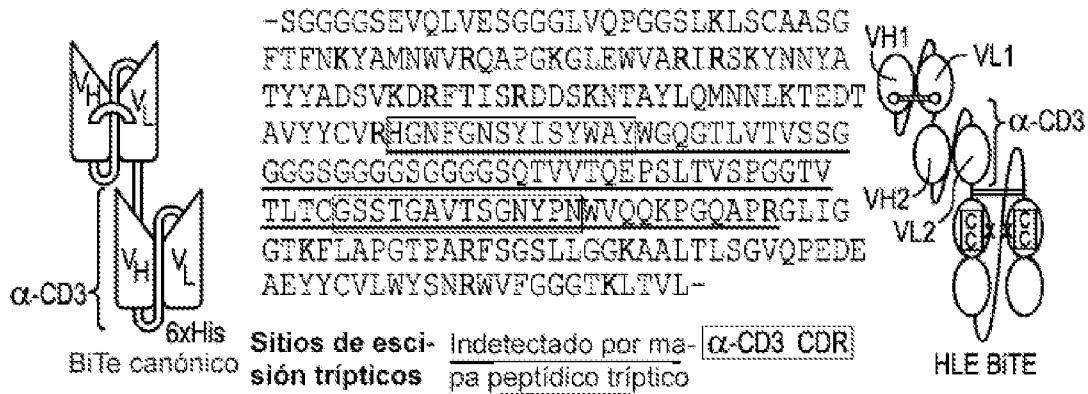


FIG. 2

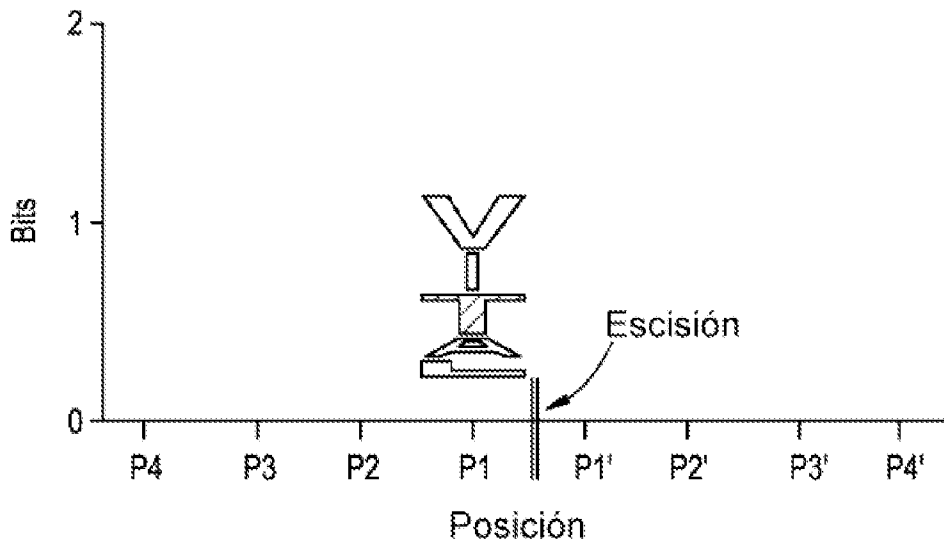


FIG. 3

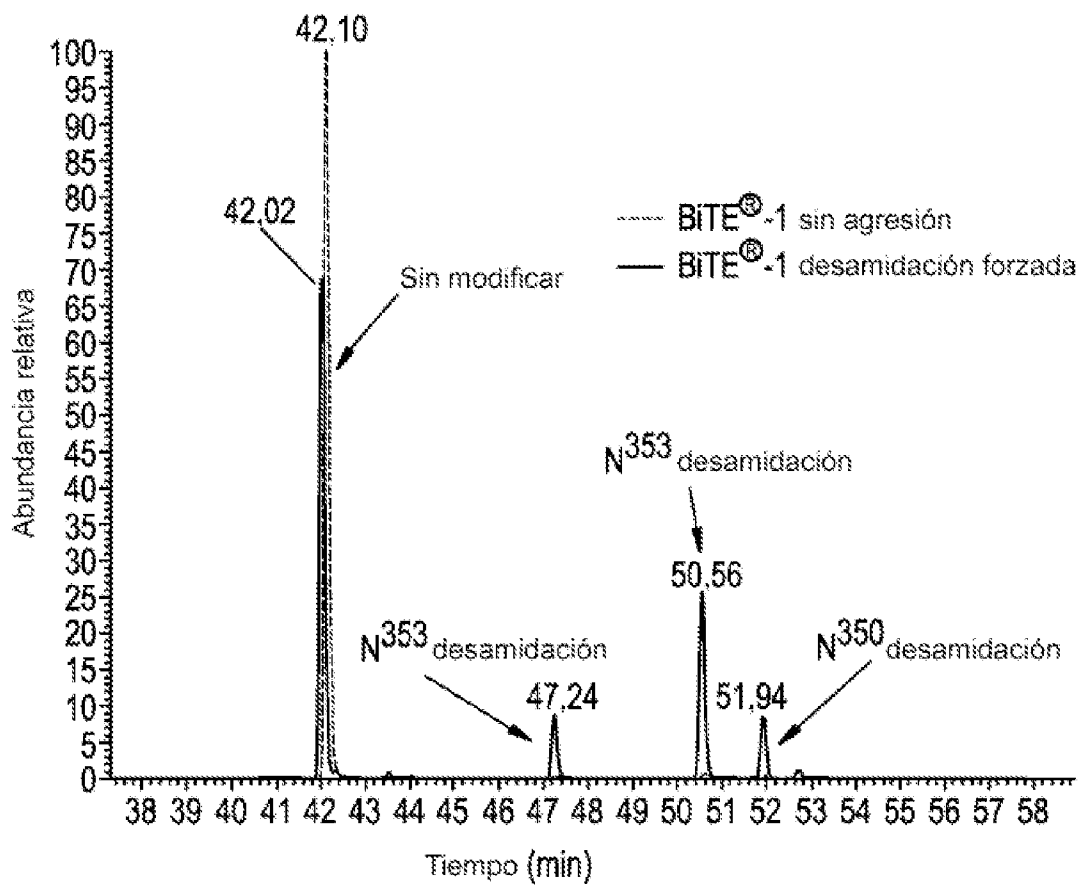


FIG. 4

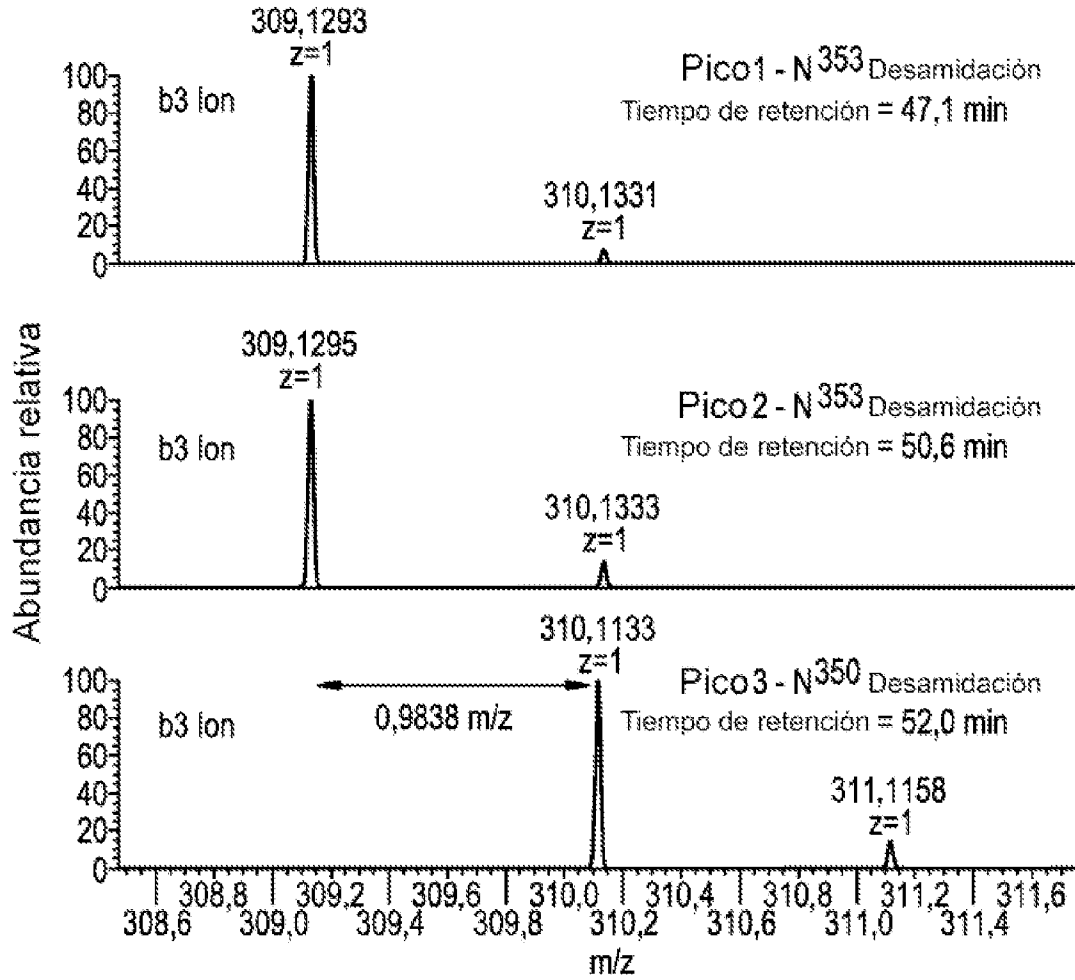


FIG. 5

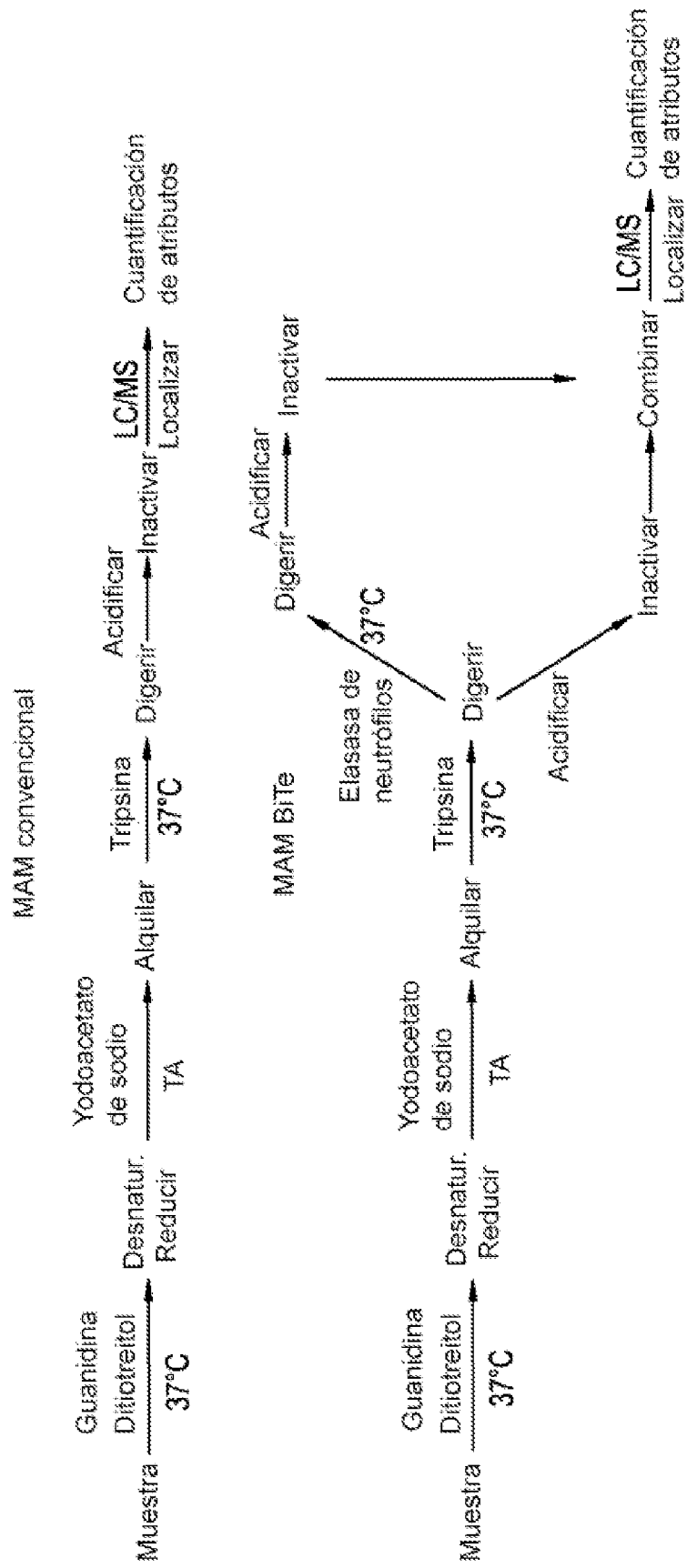


FIG. 6

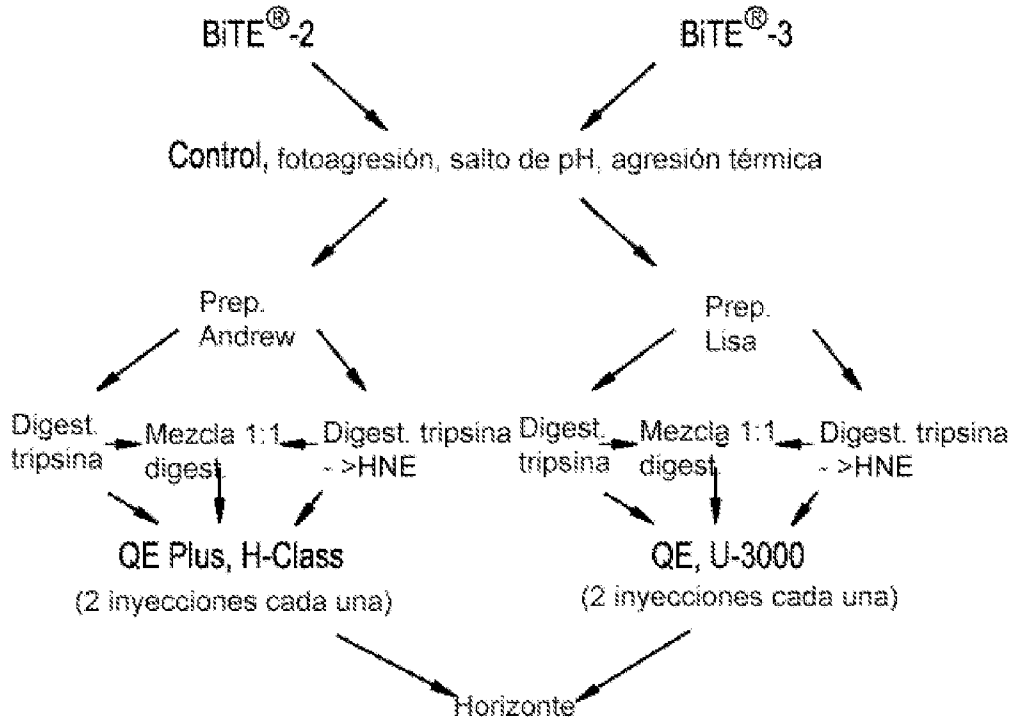


FIG. 7

MAM con digestión secuencial multienzimática basada en filtro

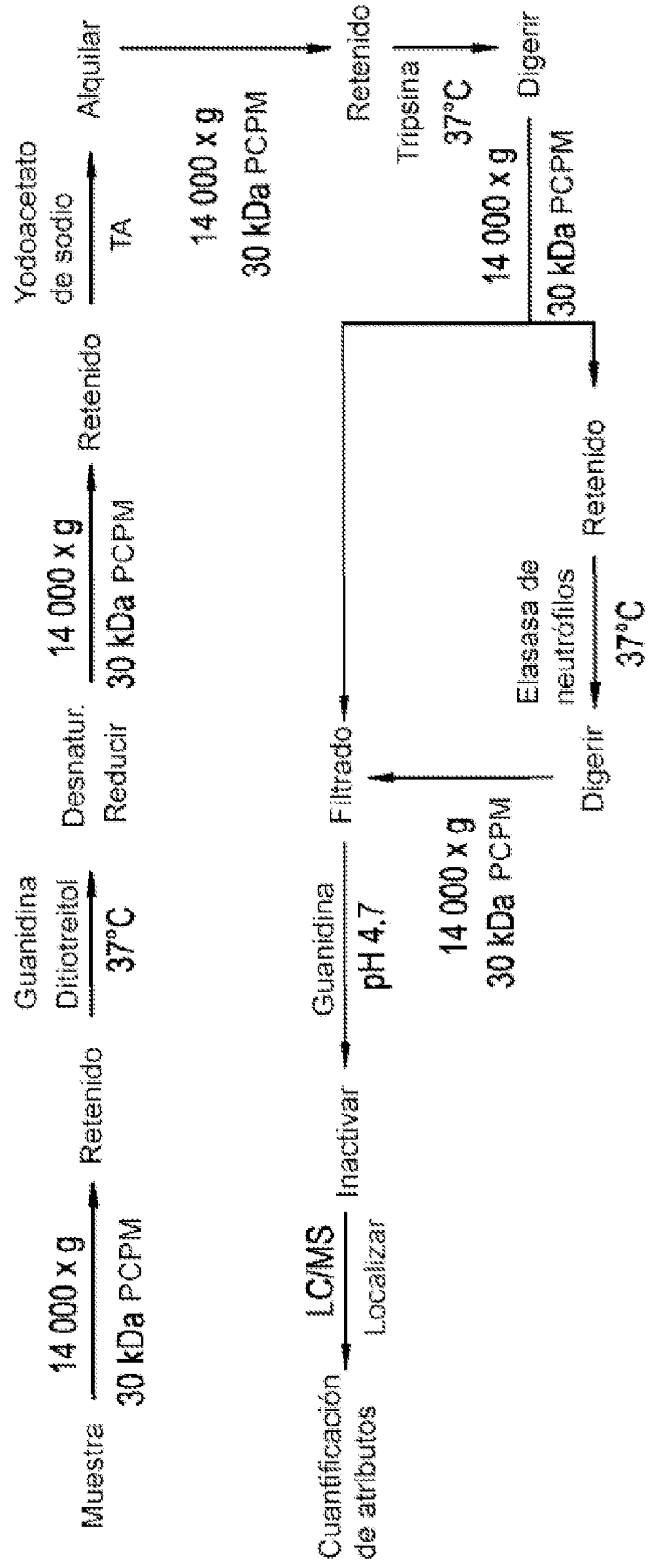
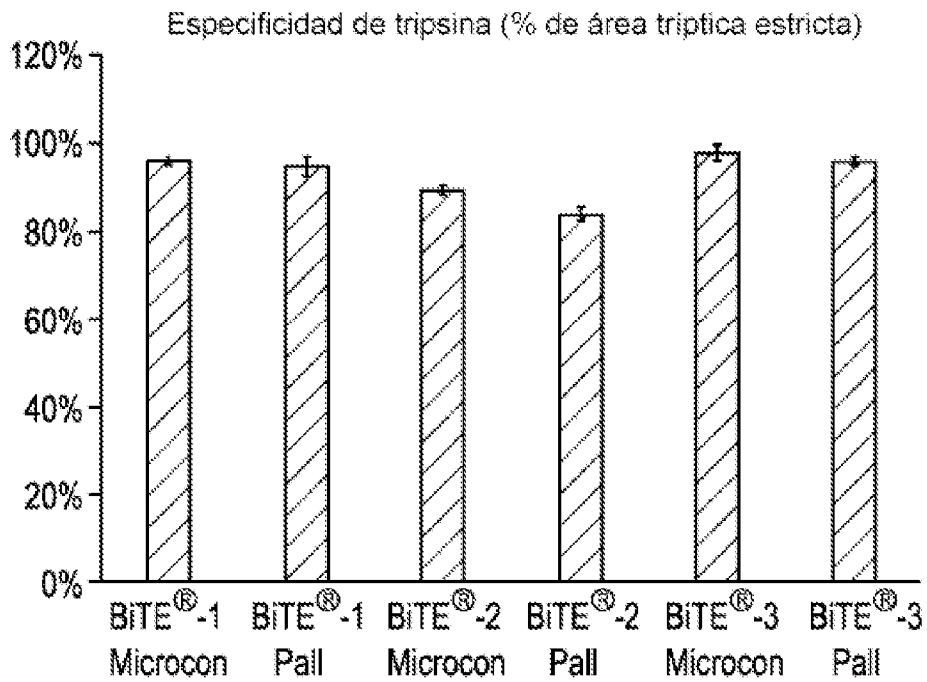


FIG. 8

% de área triptica estricta = área total de péptidos identificados (búsqueda triptica estricta)/área total de péptidos identificados (búsqueda de escisión en KRVTAL)

FIG. 9

% de área total correspondiente a conector de 8 kDa

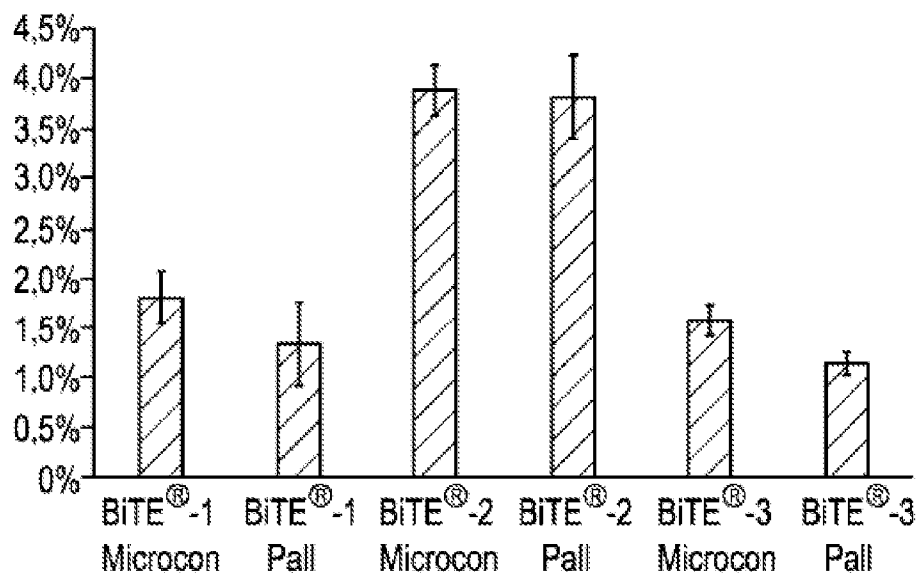


FIG. 10

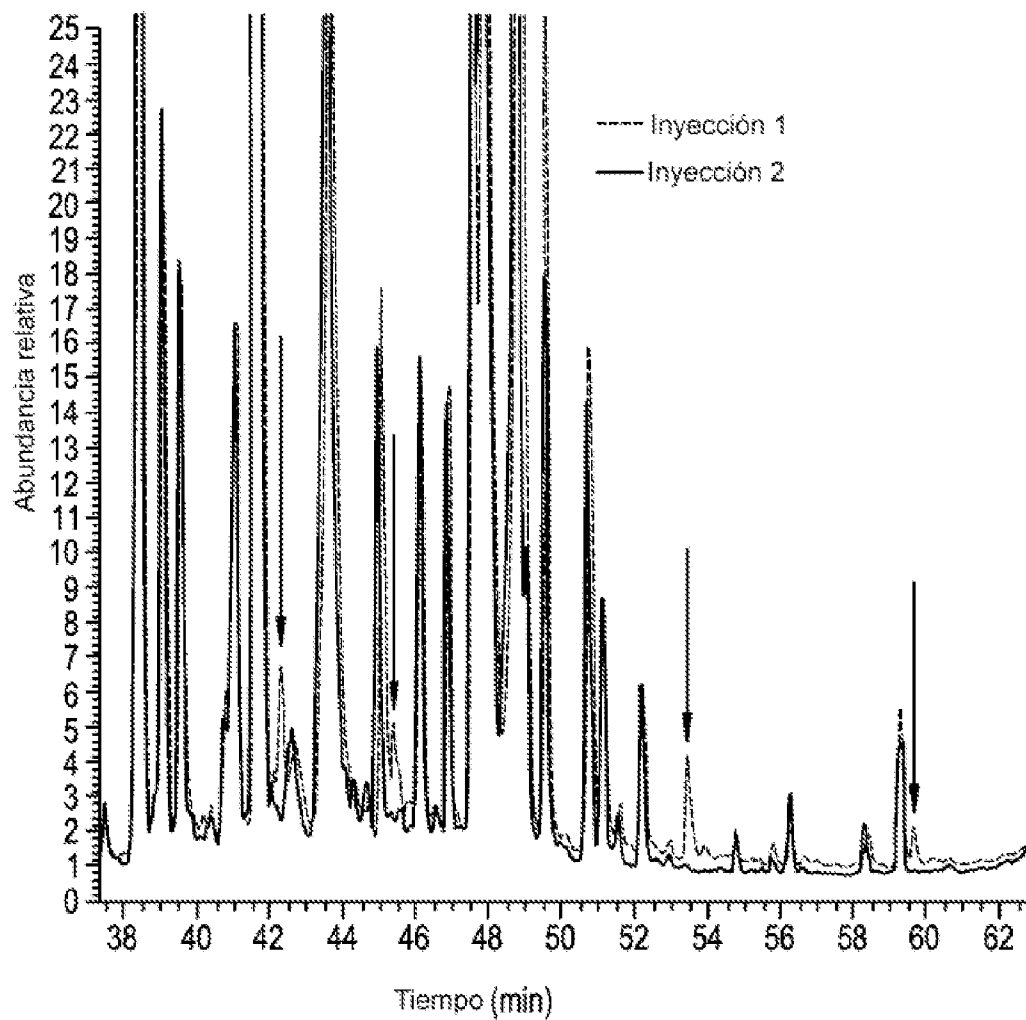


FIG. 11

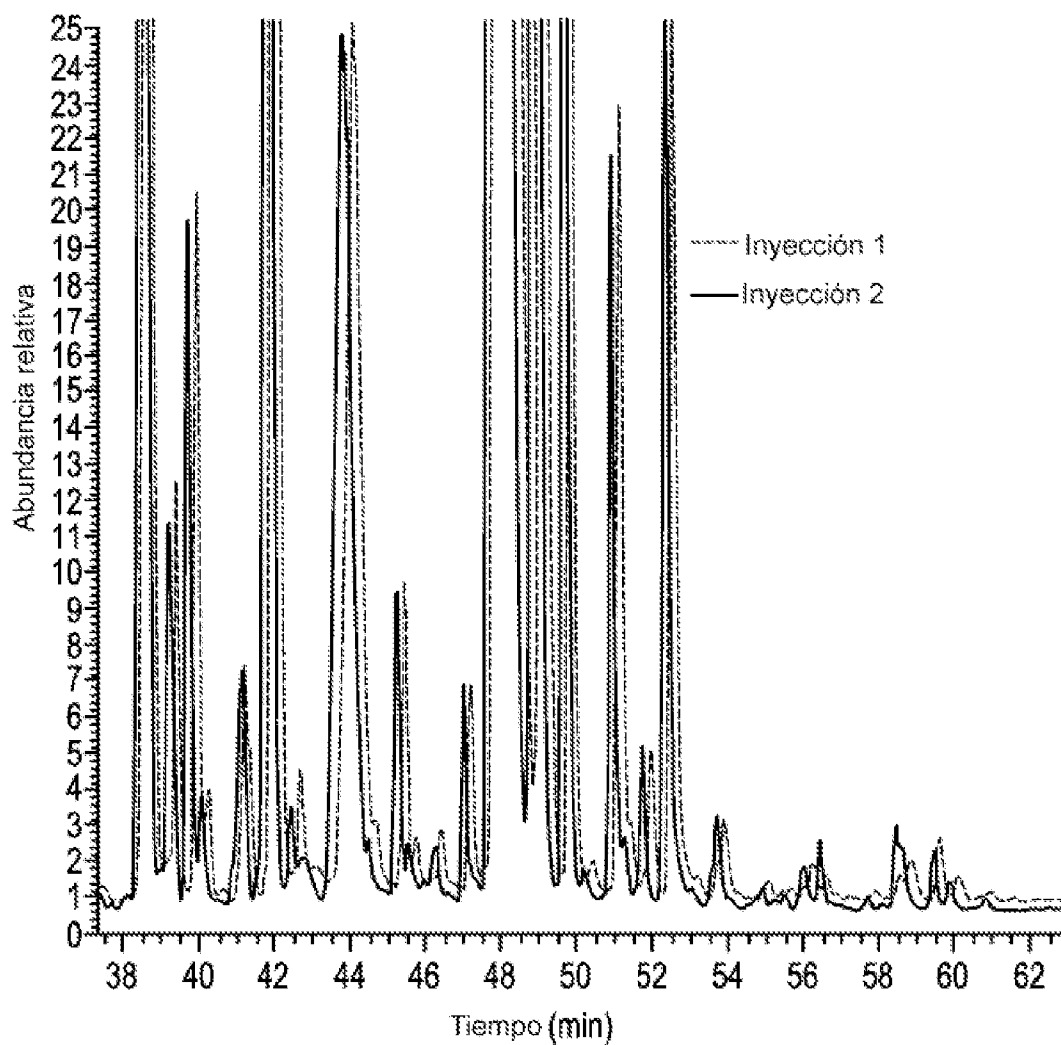
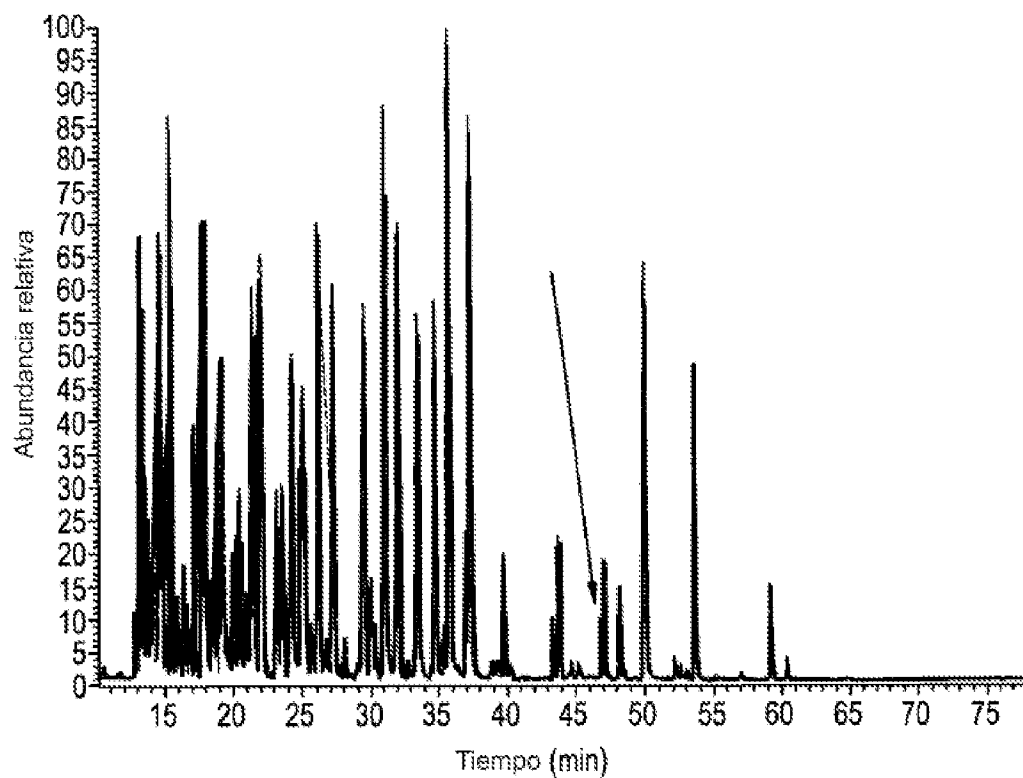


FIG. 12



- BITE[®]-2 Protocolo 4 Prep 1
- BITE[®]-2 Protocolo 4 Prep 2
- BITE[®]-2 Protocolo 4 Prep 3
- BITE[®]-2 Protocolo 5 Prep 1
- BITE[®]-2 Protocolo 5 Prep 2
- BITE[®]-2 Protocolo 5 Prep 3