

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO-ESPECTROMETRÍA DE MASA (AEX-MS)

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos de América Núm. 63/221,447, presentada el 13 de julio de 2021, que se incorpora en la presente como referencia. Esta solicitud también reclama la prioridad y el beneficio de la Solicitud Provisional Núm. U.S. 63/305,177, presentada el 31 de enero de 2022, que también se incorpora en la presente como referencia.

10 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a métodos para caracterizar variantes de carga de proteínas usando cromatografía de intercambio aniónico acoplada a espectrometría de masas usando elución en gradiente de sal creciente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Las proteínas terapéuticas son fármacos importantes para el tratamiento de cáncer, enfermedades autoinmunes, infecciones y trastornos cardiometabólicos, y representan uno de los segmentos de productos de más rápido crecimiento de la industria farmacéutica. Deben cumplir con estándares muy altos de pureza. Por lo tanto, puede ser importante monitorear las impurezas en diferentes etapas de desarrollo, producción, almacenamiento y manejo de fármacos.

- 20 Se conocen más de 600 tipos diferentes de modificaciones postraduccionales para las proteínas, muchas de ellas de una abundancia extremadamente baja, que provocan cambios sutiles en las propiedades fisicoquímicas y plantean un desafío extremo a los métodos analíticos requeridos para su caracterización. Para las proteínas producidas utilizando métodos
- 25 recombinantes, las modificaciones postraduccionales representan atributos críticos de calidad de producto, que pueden afectar la potencia de fármaco y la seguridad de paciente, como se ha mostrado para los anticuerpos monoclonales (mAb). Los modos de separación sensibles a la carga, tal como la cromatografía de intercambio iónico (IEC), la electroforesis capilar, y el enfoque isoeléctrico capilar, se usan de manera rutinaria para la separación y caracterización
- 30 de variantes de carga, debido a su alta selectividad, lo que permite la separación de variantes de proteínas con una diferencia mínima en sus propiedades, *es decir*, carga superficial neta. Sin embargo, los métodos de separación basados en carga para proteínas intactas en general no son ideales para el acoplamiento a espectrometría de masa (MS) debido a la no compatibilidad de los sistemas de agente amortiguador. Los métodos desarrollados hasta ahora por el
- 35 acoplamiento de IEC con MS sólo han sido adecuados para proteínas con punto isoeléctrico (pI)

menor que aproximadamente 6.0.

Varias proteínas terapéuticas desarrolladas con base en IgG1 e IgG4 pueden tener un pI mayor que 6.0. El desarrollo, purificación, y caracterización de estas proteínas requiere un método analítico eficiente. Se apreciará que existe una necesidad sentida durante mucho tiempo en la técnica de un método eficiente para caracterizar variantes de carga de proteínas independientemente de sus pI.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Las modalidades de ejemplo divulgadas en la presente satisfacen las demandas mencionadas anteriormente al proporcionar métodos para caracterizar variantes de carga de una proteína usando AEX-MS nativa.

La presente divulgación proporciona un método para la caracterización de estas variantes de carga de una proteína de interés. En una modalidad de ejemplo, el método comprende: (a) cargar una muestra que tiene una proteína de interés y al menos una variante de carga de esta proteína de interés a una columna de cromatografía de intercambio aniónico (AEX); (b) aplicar un gradiente de concentración de sal creciente a la columna de intercambio aniónico cargada para obtener un eluato; (c) recolectar al menos una fracción de (b); y (d) someter esta al menos una fracción a análisis de espectrometría de masas para caracterizar esta al menos una variante de carga de esta proteína de interés.

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además aplicar un gradiente de concentración de sal creciente a la columna de intercambio aniónico cargada, en donde el gradiente de sal es un gradiente de elución y varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 600 mM de sal de amonio. En un aspecto específico, la sal de amonio es acetato de amonio. En otro aspecto específico, el gradiente de sal es un gradiente de elución y varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 300 mM de sal de amonio. En otro aspecto específico, el gradiente de concentración de sal creciente aplicado es lineal.

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además monitorear el eluato de (b) para determinar la absorbancia ultravioleta y recolectar esta por lo menos una fracción que se eluye antes de la elución de la proteína de interés. En otro aspecto de la modalidad, el método comprende además monitorear el eluato de (b) para la absorbancia ultravioleta y recolectar esta por lo menos una fracción que se eluye después de la elución de la proteína de interés.

En un aspecto de la modalidad, la proteína de interés tiene un valor de pI de más de aproximadamente 6.2. En un aspecto específico de la modalidad, la proteína de interés tiene un valor de pI de aproximadamente 6.2 a aproximadamente 7.0. En un aspecto específico de la modalidad, la proteína de interés tiene un valor de pI de aproximadamente 6.2 a aproximadamente 8.7.

En un aspecto de la modalidad, la proteína de interés es un anticuerpo monoclonal

basado en IgG4. En otro aspecto de la modalidad, la proteína de interés es un anticuerpo monoclonal basado en IgG1. En aun otro aspecto de la modalidad, la proteína de interés es un anticuerpo monoclonal biespecífico.

5 En un aspecto de la modalidad, el método comprende además reducir la velocidad de flujo de (c) a través de un divisor de flujo antes de someter esta por lo menos una fracción a un espectrómetro de masas.

10 En un aspecto de la modalidad, esta al menos una variante de carga puede ser una variante ácida o una variante básica de la proteína de interés. Por ejemplo, las variantes ácidas pueden incluir desamidación, glicación, glucuronilación, y/o especies de alto peso molecular de la proteína de interés, y las variantes básicas pueden incluir lisina C-terminal, y especies glicosiladas.

15 En un aspecto de la modalidad, el método comprende además remover la N-glicosilación de Fc de esta proteína de interés antes de cargar esta muestra en esta columna de AEX. Este paso puede mejorar la separación de AEX debido a la conversión de residuos de asparagina en ácido aspártico. En un aspecto específico de esta modalidad, la N-glicosilación de Fc de esta proteína de interés se remueve usando PNGasa F. En otro aspecto específico de esta modalidad, el método puede comprender además tratar esta muestra en condiciones de digestión.

20 En algunas modalidades de ejemplo, el espectrómetro de masas se ejecuta en condiciones nativas.

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además tratar esta muestra en condiciones de digestión antes de cargar esta muestra en una columna de AEX. En un aspecto específico, las condiciones de digestión incluyen el uso de IdeS o una variante del mismo.

25 En una modalidad de ejemplo, el método comprende: (a) someter una muestra que tiene una proteína de interés y al menos una variante de carga a condiciones de desglucosilación; (b) cargar esta muestra a una columna de cromatografía de intercambio aniónico (AEX); (c) aplicar un gradiente de concentración de sal creciente a la columna de intercambio aniónico cargada para obtener un eluato; (d) recolectar al menos una fracción de (c); y (e) someter esta al menos una fracción a análisis de espectrometría de masas para caracterizar esta al menos una variante de carga de esta proteína de interés.

30 En un aspecto de la modalidad, el método comprende además aplicar un gradiente de concentración de sal creciente a la columna de intercambio aniónico cargada, en donde el gradiente de sal es un gradiente de elución y varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 600 mM de sal de amonio. En un aspecto específico, la sal de amonio es acetato de amonio. En otro aspecto específico, el gradiente de sal es un gradiente de elución y varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 300 mM de sal de amonio. En otro

35

aspecto específico, el gradiente de concentración de sal creciente aplicado es lineal.

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además monitorear el eluato de (c) para la absorbancia ultravioleta y recolectar esta por lo menos una fracción que se eluye antes de la elución de la proteína de interés. En otro aspecto de la modalidad, el método
5 comprende además monitorear el eluato de (c) para la absorbancia ultravioleta y recolectar esta por lo menos una fracción que se eluye después de la elución de la proteína de interés.

En un aspecto de la modalidad, la proteína de interés tiene un valor de pI de más de aproximadamente 6.2. En un aspecto específico de la modalidad, la proteína de interés tiene un valor de pI de aproximadamente 6.2 a aproximadamente 7.0. En un aspecto específico de la
10 modalidad, la proteína de interés tiene un valor de pI de aproximadamente 6.2 a aproximadamente 8.7.

En un aspecto de la modalidad, la proteína de interés es un anticuerpo monoclonal basado en IgG4. En otro aspecto de la modalidad, la proteína de interés es un anticuerpo monoclonal basado en IgG1. En aun otro aspecto de la modalidad, la proteína de interés es un
15 anticuerpo monoclonal biespecífico.

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además reducir la velocidad de flujo de (d) a través de un divisor de flujo antes de someter esta por lo menos una fracción a un espectrómetro de masas.

En un aspecto de la modalidad, esta al menos una variante de carga puede ser una variante ácida o una variante básica de la proteína de interés. Por ejemplo, las variantes ácidas pueden incluir desamidación, glicación, glucuronilación, y/o especies de alto peso molecular de la proteína de interés, y las variantes básicas pueden incluir lisina C-terminal y especies glicosiladas.
20

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además remover la N-glicosilación de Fc de esta proteína de interés antes de cargar esta muestra en columna de AEX. Este paso puede mejorar la separación de AEX debido a la conversión de residuos de asparagina en ácido aspártico. En un aspecto específico de esta modalidad, la N-glicosilación de Fc de esta proteína de interés se remueve usando PNGasa F.
25

En algunas modalidades de ejemplo, el espectrómetro de masas se ejecuta en condiciones nativas.
30

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además tratar esta muestra en condiciones de digestión antes de cargar esta muestra en esta columna de AEX. En un aspecto específico, las condiciones de digestión incluyen el uso de IdeS o una variante del mismo.

En una modalidad de ejemplo, el método comprende: (a) someter una muestra que tiene una proteína de interés y al menos una variante de carga a condiciones de digestión y
35 condiciones de desglicosilación; (b) cargar esta muestra a una columna de cromatografía de

intercambio aniónico (AEX); (c) aplicar un gradiente de concentración de sal creciente a la columna de intercambio aniónico cargada para obtener un eluato; (d) recolectar al menos una fracción de (c); y (e) someter esta al menos una fracción a análisis de espectrometría de masas para caracterizar esta al menos una variante de carga de esta proteína de interés.

5 En un aspecto de la modalidad, las condiciones de digestión incluyen el uso de IdeS o una variante del mismo.

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además aplicar un gradiente de concentración de sal creciente a la columna de intercambio aniónico cargada, en donde el gradiente de sal es un gradiente de elución y varía de aproximadamente 10 mM a
10 aproximadamente 600 mM de sal de amonio. En un aspecto específico, la sal de amonio es acetato de amonio. En otro aspecto específico, el gradiente de sal es un gradiente de elución y varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 300 mM de sal de amonio. En otro aspecto específico, el gradiente de concentración de sal creciente aplicado es lineal.

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además monitorear el eluato de
15 (c) para la absorbancia ultravioleta y recolectar esta por lo menos una fracción que se eluye antes de la elución de la proteína de interés. En otro aspecto de la modalidad, el método comprende además monitorear el eluato de (c) para la absorbancia ultravioleta y recolectar esta por lo menos una fracción que se eluye después de la elución de la proteína de interés.

En un aspecto de la modalidad, la proteína de interés tiene un valor de pI de más de
20 aproximadamente 6.2. En un aspecto específico de la modalidad, la proteína de interés tiene un valor de pI de aproximadamente 6.2 a aproximadamente 7.0. En un aspecto específico de la modalidad, la proteína de interés tiene un valor de pI de aproximadamente 6.2 a aproximadamente 8.7.

En un aspecto de la modalidad, la proteína de interés es un anticuerpo monoclonal
25 basado en IgG4. En otro aspecto de la modalidad, la proteína de interés es un anticuerpo monoclonal basado en IgG1. En aun otro aspecto de la modalidad, la proteína de interés es un anticuerpo monoclonal biespecífico.

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además reducir la velocidad de flujo de (d) a través de un divisor de flujo antes de someter esta por lo menos una fracción a un
30 espectrómetro de masas.

En un aspecto de la modalidad, esta al menos una variante de carga puede ser una variante ácida o una variante básica de la proteína de interés. Por ejemplo, las variantes ácidas pueden incluir desamidación, glicación, glucuronilación, y/o especies de alto peso molecular de la proteína de interés, y las variantes básicas pueden incluir lisina C-terminal y especies
35 glicosiladas.

En un aspecto de la modalidad, el método comprende además remover la N-glicosilación

de Fc de esta proteína de interés antes de cargar esta muestra en esta columna de AEX. Este paso puede mejorar la separación de AEX debido a la conversión de residuos de asparagina en ácido aspártico. En un aspecto específico de esta modalidad, la N-glicosilación de Fc de esta proteína de interés se remueve usando PNGasa F.

- 5 En algunas modalidades de ejemplo, el espectrómetro de masas se ejecuta en condiciones nativas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 ilustra los conceptos de un gradiente de pH y un gradiente de sal de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

- 10 La FIGURA 2A muestra un intervalo de agente amortiguador de pH de sales utilizadas para gradientes de pH de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 2B muestra un intervalo de pI de anticuerpos de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

- 15 La FIGURA 2C muestra los valores de pI de los anticuerpos probados con el método de AEX-MS de la invención de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 3 ilustra un sistema de AEX-MS nativo de alta tolerancia a la sal de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 4A muestra una traza de un gradiente de pH en AEX-MS de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

- 20 La FIGURA 4B muestra una traza de un gradiente de sal en AEX-MS de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 5A muestra un análisis de AEX-MS nativo de anticuerpos de pI variable de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

- 25 La FIGURA 5B muestra un análisis de AEX-MS nativo de anticuerpos de pI variable de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 5C muestra un análisis de AEX-MS nativo de anticuerpos de pI variable de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 5D muestra el pI y la efectividad de la separación de AEX para cada uno de los anticuerpos de la FIGURA 5A-C.

- 30 La FIGURA 6A muestra AEX-TIC de anticuerpos de tipo y pI variables de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 6B muestra una vista ampliada de los AEX-TIC de la FIGURA 6A de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

- 35 La FIGURA 7 muestra un AEX-TIC de un mAb de IgG4 desglucosilado, digerido con FabRICATOR de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 8A muestra un SCX-TIC de un anticuerpo de acuerdo con una modalidad

de ejemplo.

La FIGURA 8B muestra un AEX-TIC de un anticuerpo de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

5 La FIGURA 9 ilustra la desglicosilación de un anticuerpo usando PNGasa F de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 10A muestra una comparación de AEX-TIC de un anticuerpo no desglicosilado y uno desglicosilado de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 10B muestra una comparación de AEX-TIC de un anticuerpo no desglicosilado y uno desglicosilado de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

10 La FIGURA 10C muestra una comparación de AEX-TIC de un anticuerpo no desglicosilado y un anticuerpo desglicosilado de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 11A muestra una comparación de AEX-TIC de un anticuerpo no desglicosilado y uno desglicosilado de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

15 La FIGURA 11B muestra una vista ampliada del AEX-TIC de la FIGURA 11A de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 12 muestra una comparación de AEX-TIC de un anticuerpo no desglicosilado y uno desglicosilado de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 13 muestra una comparación de AEX-TIC de un anticuerpo no desglicosilado y uno desglicosilado de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

20 La FIGURA 14A muestra una comparación de AEX-TIC de un control de método no desglicosilado de un anticuerpo y una fracción casi ácida no desglicosilada del anticuerpo de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 14B muestra una vista ampliada de los AEX-TIC de la FIGURA 14A de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

25 La FIGURA 14C muestra una comparación de AEX-TIC de un control de método desglicosilado de un anticuerpo y una fracción casi ácida desglicosilada del anticuerpo de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 14D muestra una vista ampliada de los AEX-TIC de la FIGURA 14C de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

30 La FIGURA 15A muestra una comparación de AEX-TIC de un anticuerpo no desglicosilado de la sustancia farmacológica y una fracción ácida total no desglicosilada del anticuerpo de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

35 La FIGURA 15B muestra una comparación de AEX-TIC de un anticuerpo desglicosilado de la sustancia farmacológica y una fracción ácida total desglicosilada del anticuerpo de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 16 ilustra variantes de carga de Fc fácilmente separables por AEX-MS, que

incluyen glicosilación, desamidación y lisinas C-terminales, de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 17A muestra AEX-TIC de regiones Fc desglicosiladas de varios anticuerpos de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

5 La FIGURA 17B muestra una vista ampliada de los AEX-TIC de la FIGURA 17A de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 18A muestra un AEX-TIC de un control y una muestra de Fc desglicosilado estresado de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

10 La FIGURA 18B muestra una cuantificación de las variantes de carga de la FIGURA 18A de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 19 ilustra el intercambio de Fc de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

La FIGURA 20 muestra un AEX-TIC de un producto de digestión de bsAb FabRICATOR no desglicosilado de acuerdo con una modalidad de ejemplo.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La caracterización exhaustiva de las proteínas bioterapéuticas es un requisito esencial en todas las etapas de desarrollo y control de calidad final de producto. Cada proteína tendrá varias formas variantes diferentes debido a múltiples modificaciones postraduccionales que pueden alterar la distribución de carga en la superficie de la proteína. Esto puede ser debido a una modificación que altera directamente el estado de carga o al alterar indirectamente la carga superficial accesible a través de un cambio conformacional. Estas modificaciones se pueden separar cromatográficamente usando análisis de intercambio iónico (IEX).

20

Los métodos que emplean cromatografía de intercambio iónico acoplada en línea a espectrometría de masas se han desarrollado anteriormente para caracterizar variantes de carga en proteínas intactas. Sin embargo, los métodos publicados hasta ahora ilustran la caracterización de proteínas con respecto a sus variantes de carga, en donde la proteína tiene un pI de menos de 6.0. Por ejemplo, Leblanc *et al.* caracterizaron variantes de carga de albúmina de suero humano (HSA) (pI = 4.7) usando cromatografía de intercambio aniónico (AEX) acoplada en línea con una MS. Ver Leblanc *et al. J. Chroma. B*, 2018, 1095: 87–93.

25

30 Fussl *et al.* también reportaron un método de AEX basado en gradiente de pH, que se interconectó directamente con una espectrometría de masas para la caracterización de variantes de carga en el nivel de proteína intacta en condiciones nativas. Fussl *et al. J. Proteome Res.*, 2019, 18: 3689–3702. Sin embargo, la elución en gradiente de pH en el método desarrollado sólo facilitó la selectividad cromatográfica y la aplicabilidad genérica para proteínas aniónicas con valores de pI <6.5, tal como transferrina (pI = 5.2-5.6), ovoalbúmina (pI = 4.5) y Asialo α -1-AGP (pI = 2.8-3.8). *Id.* en 3690.

35

Muy recientemente, Van Schaik *et al.* aplicaron AEX-MS para monitorear múltiples atributos de calidad de la eritropoyetina biofarmacéutica (EPO, pI = 4.4-5.1). Todos los métodos mencionados anteriormente emplean una elución de gradiente de pH para separar las proteínas y sus variantes de carga.

- 5 La presente invención divulga un método AEX adecuado para caracterizar variantes de carga de proteínas, que pueden tener valores de pI de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 7.0. Se analizaron dos mecanismos principales para la elución de proteínas de la columna de AEX para estudiar la separación de variantes de carga de proteínas con un valor de pI más alto que lo que se había publicado anteriormente. Ver, por ejemplo, FIGURA 1.
- 10 En la elución en gradiente de sal, las proteínas se empujan hacia abajo de la columna desde el sitio de intercambio al sitio de intercambio al competir con los iones de sal en el gradiente de sal. Se produce un efecto de enfoque a medida que incrementa la concentración de sal. Con la elución en gradiente de pH, las proteínas eluirán de la columna cuando el pH alcance el punto donde tengan poca o ninguna carga. Una disminución adicional en el pH durante el gradiente
- 15 hará que la proteína sea más catiónica y, por lo tanto, repelida de la resina de columna. Esta es una diferencia importante de los gradientes de sal, puesto que entonces tendrán muy poca interacción con el resto de la columna.

- Las ventajas de los gradientes de pH también se observan con un incremento en la capacidad de carga de muestra, puesto que las proteínas se reenfocan bien al pH de elución,
- 20 independientemente de la posición donde se unieron originalmente en la columna. Esto también compensa el efecto del alto contenido de sal en la muestra, reduciendo de esta manera los efectos de matriz de muestra. Este método de elución de gradiente de pH usado y favorecido de forma rutinaria no fue útil para proteínas que tienen un pI de más de aproximadamente 7, puesto que es difícil lograr el pH requerido usando agentes amortiguadores
- 25 que pueden ser compatibles con dispositivos de MS (*es decir*, los gradientes de pH lineal son difíciles de lograr en el intervalo deseado de pH por encima de 7.0 usando sales compatibles con MS, que tienen un espacio de amortiguación cerca del intervalo de pI de anticuerpos). Por ejemplo, las proteínas que tienen un pI más alto en comparación a lo que se ha publicado anteriormente caerían en un espacio de amortiguación en donde no se pueden utilizar sales
- 30 compatibles con MS. Ver, por ejemplo, la FIGURA 2A. En teoría, esta separación dificulta que AEX separe los anticuerpos, debido a su pI relativamente alto, como se muestra en la FIGURA 2B. Los anticuerpos de IgG1 probados tendieron a tener un pI más alto con relación a los anticuerpos de IgG4, como se muestra en la FIGURA 2B y 2C.

- Esta descripción expone un nuevo método de AEX-MS nativo para caracterizar variantes
- 35 de carga para proteínas por AEX-MS usando un gradiente de sal.

A menos de que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos

utilizados en la presente tienen el mismo significado que normalmente se entendería por un experto en la técnica a la que pertenece la presente descripción. Aunque cualquier método o material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente se puede utilizar en la práctica o prueba, los métodos y materiales particulares se describen ahora. Todas las publicaciones mencionadas se incorporan por la presente como referencia.

Se debe entender que el término "un" significa "al menos uno"; y se debe entender que los términos "aproximadamente" y "de manera aproximada" permiten la variación estándar como se entenderá por aquellos expertos en la técnica; y donde se proporcionan intervalos, se incluyen los puntos finales.

Como se utiliza en la presente, el término "proteína" incluye cualquier polímero de aminoácido que tenga enlaces amida vinculados covalentemente. Las proteínas comprenden una o más cadenas de polímeros de aminoácidos, en general conocidas en la técnica como "polipéptidos". "Polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por residuos de aminoácidos, variantes estructurales que se presentan naturalmente relacionadas y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos vinculados mediante enlaces de péptidos, variantes estructurales que se presentan naturalmente relacionadas y análogos sintéticos que se presentan naturalmente de los mismos. "Péptidos o polipéptidos sintéticos" se refiere a un péptido o polipéptido que se presenta naturalmente. Los péptidos o polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de polipéptidos automatizado. Se conocen diversos métodos de síntesis de péptidos de fase sólida. Una proteína puede contener uno o múltiples polipéptidos para formar una biomolécula funcional individual. Una proteína puede incluir cualquiera de proteínas bioterapéuticas, proteínas recombinantes utilizadas en investigación o terapia, proteínas Trap y otras proteínas de fusión de receptor Fc quimérico, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, y anticuerpos biespecíficos. En otro aspecto de ejemplo, una proteína puede incluir fragmentos de anticuerpos, nanocuerpos, quimeras de anticuerpos recombinantes, citocinas, quimiocinas, hormonas de péptidos, y similares. Las proteínas se pueden producir usando sistemas de producción basados en células recombinantes, tal como el sistema de baculovirus de insecto, sistemas de levadura (*por ejemplo*, *Pichia* sp.), sistemas de mamífero (*por ejemplo*, células CHO y derivados de CHO como células CHO-K1). Para una revisión que analiza las proteínas bioterapéuticas y su producción, ver Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," (BIOTECHNOL. GENET. ENG. REV. 147-175 (2012)). En algunas modalidades de ejemplo, las proteínas comprenden modificaciones, aductos, y otras porciones vinculadas covalentemente. Esas modificaciones, aductos y porciones incluyen, por ejemplo, avidina, estreptavidina, biotina, glicanos (*por ejemplo*, N-acetilgalactosamina, galactosa, ácido

neuramínico, N-acetilglucosamina, fucosa, manosa, y otros monosacáridos), PEG, polihistidina, etiqueta FLAG, proteína de unión a maltosa (MBP), proteína de unión a quitina (CBP), glutatión-S-transferasa (GST), myc-epítipo, marcas fluorescentes y otros tintes, y similares. Las proteínas se pueden clasificar con base en las composiciones y la solubilidad y, por lo tanto, pueden incluir proteínas simples, tal como, proteínas globulares y proteínas fibrosas; proteínas conjugadas, tal como nucleoproteínas, glicoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, fosfoproteínas, metaloproteínas y lipoproteínas; y proteínas derivadas, tal como proteínas derivadas primarias y proteínas derivadas secundarias.

En algunas modalidades de ejemplo, la proteína de interés puede ser un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, o una proteína de fusión de Fc.

El término "anticuerpo", como se utiliza en la presente, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de estas (*por ejemplo*, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (C_{L1}). Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que se conservan más, denominadas regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, arregladas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes modalidades de ejemplo, las FR del anticuerpo anti-big-ET-1 (o porción de unión a antígeno de este) pueden ser idénticas a las secuencias de línea germinal humana, o se pueden modificar de manera natural o artificialmente. Una secuencia de consenso de aminoácidos se puede definir con base en un análisis lado a lado de dos o más CDR. El término "anticuerpo", como se utiliza en la presente, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, como se usan en la presente, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína que se presentan naturalmente, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo se pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de modificación genética recombinante que implican la

manipulación y expresión de ADN que codifica para dominios variables y opcionalmente dominios constantes de anticuerpo. Estas ADN es conocido y/o está fácilmente disponible de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (que incluyen, *por ejemplo*, bibliotecas de fago-anticuerpo), o se puede sintetizar. El ADN se puede secuenciar y manipular químicamente o por el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para arreglar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, adicionar o eliminar aminoácidos, etc.

Como se usa en la presente, un "fragmento de anticuerpo" incluye una porción de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región variable o de unión a antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fc, un fragmento scFv, un fragmento Fv, un diacuerpo dsFv, un fragmento dAb, un fragmento Fd', un fragmento Fd, y una región de región determinante de complementariedad (CDR) aislada, así como triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena individual, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos Fv son la combinación de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, y las proteínas de ScFv son moléculas de polipéptidos de cadena individual recombinantes en las que las regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina se conectan por un ligador de péptido. Un fragmento de anticuerpo se puede producir por diversos medios. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo se puede producir de manera enzimática o químicamente por fragmentación de un anticuerpo intacto y/o se puede producir de manera recombinante a partir de un gen que codifica para la secuencia de anticuerpo parcial. De manera alternativa o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo se puede producir de manera total o parcialmente sintética. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo de cadena individual. De manera alternativa o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que se vinculan entre sí, por ejemplo, por enlaces disulfuro. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular.

El término "anticuerpo monoclonal", como se utiliza en la presente, no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. Un anticuerpo monoclonal se puede derivar de un clon individual, que incluye cualquier clon eucariota, procariota, o de fago, por cualquier medio disponible o conocido en la técnica. Los anticuerpos monoclonales útiles con la presente descripción se pueden preparar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante, y expresión en fagos, o una combinación de los mismos.

El término "proteínas de fusión de Fc", como se utiliza en la presente, incluye parte o la

totalidad de dos o más proteínas, una de las cuales es una porción Fc de una molécula de inmunoglobulina, que no se fusionan en su estado natural. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (que incluyen el dominio Fc) se ha descrito, por ejemplo, por Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 10535, 1991; Byrn *et al.*, Nature 344:677, 1990; y Hollenbaugh *et al.*, "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Supl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11, 1992. "Proteínas de fusión de Fc de receptor" comprenden uno o más de uno o más dominios extracelulares de un receptor acoplado a una porción Fc, que en algunas modalidades comprende una región bisagra seguida por un dominio CH2 y CH3 de una inmunoglobulina. En algunas modalidades, la proteína de fusión a Fc contiene dos o más cadenas de receptor distintas que se unen a uno o más ligandos. Por ejemplo, una proteína de fusión de Fc es una trampa, tal como, por ejemplo, una trampa de IL-1 (*por ejemplo*, Rilonacept, que contiene la región de unión al ligando de RAcP de IL-1 fusionada a la región extracelular de IL-1R1 fusionada a Fc de hlgG1; ver la patente de Estados Unidos de América Núm. 6,927,004, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad), o una trampa de VEGF (*por ejemplo*, Aflibercept, que contiene el dominio de Ig 2 del receptor de VEGF Flt1 fusionado al dominio de Ig 3 del receptor de VEGF Flk1 fusionado a Fc de hlgG1; *por ejemplo*, SEQ ID NO:1; ver la Patente de Estados Unidos de América Núm. 7,087,411 y 7,279,159, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad)

Como se utiliza en la presente, el término general "modificaciones postraduccionales" o "MPT" se refiere a modificaciones covalentes que experimentan los polipéptidos, ya sea durante (modificación cotraduccional) o después (modificación postraduccional) de su síntesis ribosómica. Las PTM en general se introducen por enzimas o rutas enzimáticas específicas. Muchos se presentan en el sitio de una secuencia de proteína característica específica (secuencia de firma) dentro de la estructura principal de proteína. Se han registrado varios cientos de PTM, y estas modificaciones invariablemente influyen en algún aspecto de la estructura o función de una proteína (Walsh, G. "Proteins" (2014) segunda edición, publicada por Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Las diversas modificaciones postraduccionales incluyen, pero no se limitan a, escisión, extensiones N-terminal, degradación de proteínas, acilación del extremo N, biotinilación (acilación de residuos de lisina con una biotina), amidación del extremo C, glicosilación, yodación, unión covalente de grupos prostéticos, acetilación (la adición de un grupo acetilo, normalmente en el extremo N de la proteína), alquilación (la adición de un grupo alquilo (*por ejemplo*, metilo, etilo, propilo) usualmente en residuos de lisina o arginina), metilación, adenilación, ADP-ribosilación, enlaces cruzados covalentes dentro de, o entre, cadenas de polipéptidos, sulfonación, prenilación, modificaciones dependientes de vitamina C (hidroxilaciones de prolina y lisina y amidación carboxi terminal),

modificación dependiente de vitamina K en donde la vitamina K es un cofactor en la carboxilación de residuos de ácido glutámico que da por resultado la formación de un γ -carboxiglutamato (un residuo de glu), glutamilación (enlace covalente de residuos de ácido glutámico), glicilación (residuos de glicina de enlace covalente), glicosilación (adición de un grupo glicosilo a ya sea asparagina, hidroxilisina, serina o treonina, dando por resultado una glicoproteína), isoprenilación (adición de un grupo isoprenoide tal como farnesol y geranilgeraniol), lipoilación (unión de una funcionalidad lipoato), fosfopanteteinilación (adición de una porción 4'-fosfopanteteinilo de la coenzima A, como en la biosíntesis de ácidos grasos, policétidos, péptidos no ribosómicos y leucina), fosforilación (adición de un grupo fosfato, usualmente a serina, tirosina, treonina o histidina), y sulfatación (adición de un grupo sulfato, usualmente a un residuo de tirosina). Las modificaciones postraduccionales que cambian la naturaleza química de los aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, citrulinación (la conversión de arginina a citrulina por deiminación), y desamidación (la conversión de glutamina a ácido glutámico o asparagina a ácido aspártico). Las modificaciones postraduccionales que implican cambios estructurales incluyen, pero no se limitan a, formación de puentes disulfuro (enlace covalente de dos aminoácidos de cisteína) y escisión proteolítica (escisión de una proteína en un enlace de péptido). Ciertas modificaciones postraduccionales implican la adición de otras proteínas o péptidos, tal como ISGilación (enlace covalente a la proteína ISG15 (Gen Estimulado por Interferón)), SUMOilación (enlace covalente a la proteína SUMO (Pequeño MOdificador relacionado con Ubiquitina)) y ubiquitinación (enlace covalente a la proteína ubiquitina). Ver European Bioinformatics Institute Protein Information ResourceSIB Swiss Institute of Bioinformatics, European Bioinformatics Institute Drs - Drosomycin precursor - Drosophila melanogaster (Fruit fly) - Drs gene & protein, <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist> (última visita el 15 de enero de 2019) para conocer un vocabulario controlado más detallado de los PTM seleccionados por UniProt.

Como se utiliza en la presente, el término “variantes de carga”, se refiere al complemento completo de variantes de producto incluyendo, pero no limitado a especies ácidas, y especies básicas (*por ejemplo*, variantes de Lys). En ciertas modalidades, estas variantes pueden incluir agregados de producto y/o fragmentos de producto, en la medida en que esta agregación y/o fragmentación de por resultado una variación de carga de producto.

Como se utiliza en la presente, el término “especie ácida” se refiere a las variantes de una proteína que se caracterizan por una carga ácida general. Los ejemplos de especies ácidas pueden incluir, pero no se limitan a, variantes de desamidación, variantes de afucosilación, variantes de oxidación, variantes de metilglioxal (MGO), variantes de glicación, y variantes de ácido cítrico. Las variantes de estructura de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, variantes de glicosilación y variantes de acetona. Las variantes de fragmentación de ejemplo incluyen

cualquier especie de proteína modificada de la molécula diana debido a la disociación de la cadena de péptido, modificaciones enzimáticas y/o químicas, que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fc y Fab, fragmentos que carecen de un Fab, fragmentos que carecen de un dominio variable de cadena pesada, variantes de truncamiento C-terminal, variantes con escisión de Asp N-terminal en la cadena ligera y variantes que tienen truncamiento N-terminal de la cadena ligera. Otras variantes de especies ácidas incluyen variantes que comprenden disulfuros no emparejados, proteínas de células hospedadoras, y ácidos nucleicos hospedadores, materiales cromatográficos, y componentes de medios. Comúnmente, las especies ácidas se eluyen después de que el pico principal durante el CEX o más tarde que el pico principal durante el análisis de AEX.

Como se utiliza en la presente, el término “especie básica” se refiere a las variantes de una proteína, por ejemplo, un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este, que se caracterizan por una carga básica general, con relación a la especie variante de carga primaria presente dentro de la proteína. Las especies básicas de ejemplo pueden incluir, pero no se limitan a, variantes de lisina, isomerización de ácido aspártico, formación de succinimida en asparagina, oxidación de metionina, amidación, formación de enlace disulfuro incompleto, mutación de serina a arginina, aglicosilación, fragmentación y agregación. Comúnmente, las especies básicas se eluyen más tarde que el pico principal durante el CEX o antes que el pico principal durante el análisis de AEX.

Como se utiliza en la presente, “cromatografía de intercambio iónico” se puede referir a separaciones que incluyen cualquier método por el cual se separan dos sustancias con base en las diferencias en sus respectivas cargas iónicas, ya sea en la molécula de interés y/o material cromatográfico en su conjunto o localmente en regiones específicas de la molécula de interés y/o material cromatográfico, y por consiguiente, se puede emplear ya sea material de intercambio catiónico o material de intercambio aniónico. La cromatografía de intercambio iónico separa las moléculas con base en las diferencias entre las cargas locales de las moléculas de interés y las cargas locales del material cromatográfico. Una columna de cromatografía de intercambio iónico empaquetada o un dispositivo de membrana de intercambio iónico se puede operar en un modo de unión y elución, un modo de flujo continuo, o un modo híbrido. Después de lavar la columna o el dispositivo de membrana con un agente amortiguador de equilibrio u otro agente amortiguador, la recuperación de producto se puede lograr al incrementar la resistencia iónica (*es decir*, conductividad) del agente amortiguador de elución para competir con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Cambiar el pH y por lo tanto alterar la carga del soluto puede ser otra manera de lograr la elución del soluto. El cambio en la conductividad o pH puede ser gradual (elución de gradiente) o gradual (elución de paso). Los sustituyentes aniónicos o catiónicos se pueden unir a matrices a fin de

formar soportes aniónicos o catiónicos para la cromatografía. Los ejemplos no limitantes de sustituyentes de intercambio aniónico incluyen grupos dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amina cuaternaria (Q).

5 Como se utiliza en la presente, el término “espectrómetro de masas” incluye un dispositivo capaz de identificar especies moleculares específicas y medir sus masas exactas. El término significa que incluye cualquier detector molecular en el que se puede eluir un polipéptido o péptido para la detección y/o caracterización. Un espectrómetro de masas puede incluir tres partes principales: la fuente de iones, el analizador de masas, y el detector. La función de la fuente de iones es crear iones en fase gaseosa. Los átomos, moléculas o grupos
10 de analitos se pueden transferir a la fase gaseosa e ionizar ya sea concurrentemente (como en la ionización por electropulverización). La elección de la fuente de iones depende en gran medida de la aplicación.

En algunas modalidades, el espectrómetro de masas puede ser un espectrómetro de masas por electropulverización.

15 Como se utiliza en la presente, el término “ionización por electropulverización” o “ESI” se refiere al proceso de ionización por pulverización en el que ya sea los cationes o aniones en solución se transfieren a la fase gaseosa a través de la formación y desolvatación a presión atmosférica de una corriente de gotas altamente cargadas que resultan de la aplicación de una diferencia de potencial entre la punta de la aguja de electropulverización que contiene la
20 solución y un contraelectrodo.

En algunas modalidades de ejemplo, el espectrómetro de masas de ionización por electropulverización puede ser un espectrómetro de masas de ionización por nano-pulverización.

El término “nanoelectropulverización” o “nanopulverización”, como se utiliza en la presente, se refiere a la ionización por electropulverización a una velocidad de flujo de solvente
25 muy baja, habitualmente cientos de nanolitros por minuto de solución de muestra o inferior, a menudo sin el uso de una administración de solvente externo. La configuración de infusión de electropulverización que forma una nanoelectropulverización puede usar un emisor de nanoelectropulverización estático o un emisor de nanoelectropulverización dinámico. Un emisor de nanoelectropulverización estática realiza un análisis continuo de volúmenes de solución de
30 muestra pequeña (analito) durante un período de tiempo extendido. Un emisor de nanoelectropulverización dinámico utiliza una columna capilar y un sistema de administración de solvente para realizar separaciones cromatográficas en mezclas antes del análisis por el espectrómetro de masas.

Como se utiliza en la presente, el término “analizador de masas” incluye un dispositivo
35 que puede separar especies, es decir, átomos, moléculas, o grupos, de acuerdo con su masa. Los ejemplos no taxativos de analizadores de masas que se podrían emplear para la

secuenciación rápida de proteínas son tiempo de vuelo (TOF), sector magnético / eléctrico, filtro de masas de cuadrupolo (Q), trampa de iones de cuadrupolo (QIT), orbitrap, resonancia de ciclotrón de ión de transformada de Fourier (FTICR) y también la técnica de espectrometría de masas de acelerador (AMS).

5 En algunas modalidades de ejemplo, la espectrometría de masas se puede realizar en condiciones nativas.

Como se utiliza en la presente, el término “condiciones nativas” o “MS nativa” o “ESI-MS nativa” puede incluir una realización de espectrometría de masas en condiciones que conservan interacciones no covalentes en un analito. Para una revisión detallada sobre la MS nativa, hacer referencia a la revisión: Elisabetta Boeri Erba y Carlo Petosa, *The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes*, 24 Protein Science 1176–1192 (2015). Algunas de las distinciones entre ESI nativo y ESI regular se ilustran en la tabla 1 y la FIGURA 1 (Hao Zhang *et al.*, *Native mass spectrometry of photosynthetic pigment-protein complexes*, 587 FEBS Letters 1012–1020 (2013)).

15 En algunas modalidades de ejemplo, el espectrómetro de masas puede ser un espectrómetro de masas en tándem.

Como se utiliza en la presente, el término “espectrometría de masas en tándem” incluye una técnica donde la información estructural sobre moléculas de muestra se obtiene por el uso de múltiples etapas de selección de masas y separación de masas. Un requisito previo es que las moléculas de la muestra se puedan transferir a la fase gaseosa e ionizar intactas y que se pueda inducir que se desmoronen de alguna manera predecible y controlable después del primer paso de selección de masas. MS/MS de múltiples etapas, o MSⁿ, se puede realizar al seleccionar y al aislar primero un ion precursor (MS²), al fragmentarlo, al aislar un ion de fragmento primario (MS³), al fragmentarlo, al aislar un fragmento secundario (MS⁴), etc., siempre que se pueda obtener información significativa o la señal de ion de fragmento sea detectable. La MS en tándem se ha realizado con éxito con una amplia variedad de combinaciones de analizador. Qué analizadores combinar para una cierta aplicación está determinado por muchos factores diferentes, tal como la sensibilidad, la selectividad y la velocidad, pero también el tamaño, el costo y la disponibilidad. Las dos categorías principales de métodos de MS en tándem son tándem en el espacio y tándem en el tiempo, pero también hay híbridos donde los analizadores en tándem en el tiempo se acoplan en el espacio o con analizadores en tándem en el espacio. Un espectrómetro de masas en tándem en el espacio comprende una fuente de iones, un dispositivo de activación de iones precursores, y al menos dos analizadores de masas no de atrapamiento. Las funciones de separación m/z específicas se pueden diseñar tal que en una sección del instrumento se seleccionen iones, se disocien en una región intermedia y los iones de producto se transmitan entonces a otro analizador para la separación por m/z y la

adquisición de datos. En el espectrómetro de masas en tándem en el tiempo, los iones producidos en la fuente de iones se pueden atrapar, aislar, fragmentar, y separar por m/z en el mismo dispositivo físico.

5 Los péptidos identificados por el espectrómetro de masas se pueden utilizar como representantes sustitutos de la proteína intacta y sus modificaciones postraduccionales. Se pueden utilizar para la caracterización de proteínas por la correlación de datos de MS/MS experimentales y teóricos, estos últimos generados a partir de posibles péptidos en una base de datos de secuencias de proteínas. La caracterización puede incluir, pero no se limita a, secuenciar aminoácidos de los fragmentos de proteína, determinar la secuenciación de proteína, 10 determinar la secuenciación de novo de proteína, ubicar modificaciones postraduccionales, o identificar modificaciones postraduccionales, o análisis de comparabilidad, o combinaciones de los mismos.

Como se utiliza en la presente, el término “base de datos” se refiere a herramientas bioinformáticas que proporcionan la posibilidad de buscar los espectros de MS-MS no 15 interpretados contra todas las secuencias posibles en las bases de datos. Los ejemplos no limitantes de estas herramientas son Mascot (<http://www.matrixscience.com>), Spectrum Mill (<http://www.chem.agilent.com>), PLGS (<http://www.waters.com>), PEAKS (<http://www.bioinformaticssolutions.com>), Proteinpilot (<http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot>), Phenyx (<http://www.phenyx-ms.com>), 20 Sorcerer (<http://www.sagenresearch.com>), OMSSA (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/>), X!Tandem (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>), Protein Prospector ([http://www. http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm](http://www.prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm)), Byonic (<https://www.proteinmetrics.com/products/byonic>) o Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest>).

25 Como se utiliza en la presente, el término “digestión” se refiere a la hidrólisis de uno o más enlaces de péptidos de una proteína. Hay varios enfoques para llevar a cabo la digestión de una proteína en una muestra usando un agente hidrolizante apropiado, por ejemplo, digestión enzimática o digestión no enzimática.

Como se utiliza en la presente, el término “agente hidrolizante” se refiere a cualquiera o combinación de una gran cantidad de agentes diferentes que pueden realizar la digestión de 30 una proteína. Los ejemplos no taxativos de agentes hidrolizantes que pueden llevar a cabo la digestión enzimática incluyen tripsina, endoproteinasa Arg-C, endoproteinasa Asp-N, endoproteinasa Glu-C, proteasa de membrana externa T (OmpT), enzima degradadora de inmunoglobulina de *Streptococcus pyogenes* (IdeS), quimotripsina, pepsina, termolisina, papaína, pronasa, y proteasa de *Aspergillus Saitoi*. Los ejemplos no limitantes de agentes 35 hidrolizantes que pueden llevar a cabo la digestión no enzimática incluyen el uso de alta temperatura, microondas, ultrasonido, alta presión, infrarrojos, solventes (los ejemplos no

limitantes son etanol y acetonitrilo), digestión enzimática inmovilizada (IMER), enzimas inmovilizadas en partículas magnéticas, y enzimas inmovilizadas en chip. Para una revisión reciente que analiza las técnicas disponibles para la digestión de proteínas, ver *Switazar et al.*, “Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments” (J. Proteome Research 2013, 12, 1067-1077). Uno o una combinación de agentes hidrolizantes puede escindir enlaces de péptidos en una proteína o polipéptido, de una manera específica de secuencia, generando una colección predecible de péptidos más cortos.

EJEMPLOS

Las muestras de mAb terapéutico basadas en IgG1 e IgG4 se analizaron ya sea directamente o se trataron con PNGasa F y/o FabRICATOR antes de inyectarse y separarse en una columna de YMC BioPro QA-F SAX (4.6 x 100 mm). Se aplicó una plataforma de LC-MS nativa anteriormente reportada para acomodar la velocidad de flujo analítico (0.4 mL/min) con ionización por nanoelectropulverización (NSI). Se utilizaron fases móviles basadas en acetato de amonio que varían de 10 a 300 mM para desarrollar un gradiente basado en sal para la elución de mAb. Para dilucidar los picos variantes que resultan de ya sea las reacciones de desamidación o desglicosilación específicas del sitio, se realizaron análisis de fraccionamiento fuera de línea y mapeo de péptidos tripticos. Los péptidos sintéticos también se utilizaron para diferenciar los productos de desamidación (*por ejemplo*, iso-Asp versus Asp) con base en la alineación de tiempo de retención.

Para desarrollar el método de la presente invención, primero se investigó AEX usando ya sea modos de pH o gradiente de sal, como se ilustra en la FIGURA 1. El sistema utilizado fue un Dionex Ultimate 3000 HPLC – Q Exactive UHMR. Un sistema y método de ejemplo para AEX-MS se describe en Yan *et al.*, 2020, *J Am Soc Mass Spectrom*, 31:2171-2179, que se incorpora por la presente como referencia, y se ilustra en la FIGURA 3.

Los experimentos que usan AEX-MS con un gradiente de pH o un gradiente de sal se muestran en la FIGURA 4A y 4B. No se puede lograr un gradiente de pH lineal con el intervalo de pH deseado para el análisis de AEX de mAb utilizando fases móviles basadas en amoníaco compatibles con MS. Sin embargo, se puede lograr un gradiente de sal lineal utilizando fases móviles compatibles con MS. La plataforma de LC-MS nativa desarrollada puede tolerar concentraciones de sal de hasta 600 mM.

Se probó un amplio intervalo de anticuerpos utilizando el sistema de AEX-MS para determinar qué mAb se beneficiarían más de la separación de AEX. Las TIC de AEX de los anticuerpos probados se muestran en orden creciente de pI en la FIGURA 5A, 5B y 5C, con un resumen de los resultados en 5D. En general, los mAb con pI relativamente más bajos (pH < 7) tuvieron una mejor separación de AEX.

Se realizó otra comparación de mAb y bsAb utilizando el método AEX-MS de la

invención. Los AEX-TIC de escala completa se muestran en la FIGURA 6A y los AEX-TIC de zoom 3x se muestran en la FIGURA 6B. Se demostró que el método de AEX-MS nativo es adecuado para la mayoría de las moléculas de IgG4 con pI moderado, lo que permite la identificación de diversas especies ácidas y básicas, y menos útil para los mAb de IgG1 con pI alto. En general, la separación de AEX mejoró para las moléculas con un pI más bajo. Las variantes ácidas comunes observadas incluyeron desamidación, glicación, y NeuAc. Las variantes básicas comunes observadas incluyeron especies parciales y no glicosiladas, y especies con lisinas C-terminales.

Se realizó un análisis adicional en mAb IgG4 desglicosilados que se trataron con IdeS (FabRICATOR^{MR} de Genovis) para realizar el monitoreo de atributos Fc, como se muestra en la FIGURA 7. Se encontró que los picos ácidos específicos se correlacionan con la desamidación específica de sitio. Las identidades se confirmaron al fraccionar una muestra de IgG4 sometida a estrés térmico desglicosilada y digerida con FabRICATOR^{MR}, realizando un mapeo de péptido reducido posterior y al comparar los resultados contra péptidos sintéticos.

Se realizó una comparación entre SCX-MS y AEX-MS para Ab21, como se muestra en la FIGURA 8A versus 8B. AEX-MS fue capaz de identificar un mayor número de variantes en comparación a SCX-MS, lo que demuestra que para las proteínas con pI más bajos, AEX puede ser una alternativa útil a SCX.

Se realizaron mejoras adicionales al método de la presente invención. La separación de AEX se mejoró al desglicosilar el anticuerpo de analito con PNGasa F, disminuyendo el pI de la muestra, como se ilustra en la FIGURA 9. Los anticuerpos no desglicosilados y desglicosilados se sometieron a análisis de AEX-MS y se compararon los AEX-TIC. La desglicosilación redujo el pI de mAb, lo que dio por resultado una elución posterior y una separación y resolución de AEX mejoradas, como se muestra en la FIGURA 10A-10C. Para los mAb con pI relativamente altos (pH > 7), el paso de desglicosilación puede ayudar a la retención de la molécula, pero la mejora en la resolución no fue tan significativa como para los mAb con pI más bajos.

Una comparación adicional de mAb no desglicosilado y desglicosilado sometido a AEX-MS se muestra en la FIGURA 11A, con un acercamiento en la FIGURA 11B. El método fue capaz de detectar una gran cantidad de especies básicas y ácidas y diferenciar diferentes modificaciones de proteínas. Después de la desglicosilación, se mejoró la resolución general. Las variantes básicas detectadas incluyeron lisinas C-terminales y especies parcialmente glicosiladas convertidas. Las variantes ácidas detectadas incluyeron especies de desamidación, glicación/glucuronilación, y alto peso molecular (HMW).

Se llevó a cabo una comparación similar para otro anticuerpo como se muestra en la FIGURA 12. Nuevamente, la resolución de AEX mejoró en gran medida después de la

desglicosilación. Las variantes básicas detectadas incluyeron lisinas C-terminales, especies no glicosiladas, y especies parcialmente glicosiladas convertidas. Las variantes ácidas detectadas incluyeron especies de desamidación y glicación/glucuronilación.

5 El análisis de AEX-MS con y sin desglicosilación se llevó a cabo para otro anticuerpo como se muestra en la FIGURA 13. Nuevamente, la resolución de AEX mejoró en gran medida después de la desglicosilación. Las variantes básicas detectadas incluyeron lisina C-terminal y especies parcialmente glicosiladas convertidas. Las variantes ácidas detectadas incluyeron desamidación, glicación/glucuronilación y especies de NeuAc.

10 Existe una variedad de aplicaciones potenciales para el método de la invención. Por ejemplo, se utilizó AEX-MS para la caracterización en profundidad de variantes de carga enriquecidas como se muestra en la FIGURA 14. Las muestras de control del método (Mtd ctrl) se compararon a especies casi ácidas fraccionadas (ácidas 1) en muestras no desglicosiladas y glicosiladas y se sometieron a análisis AEX-MS. Las variantes básicas observadas en el control del método incluyen succinimida y lisina C-terminal, como se muestra en la FIGURA 14A y 14B. Las variantes ácidas observadas incluyen desamidación, glicación/glucuronilación y ácido siálico (NeuAc). El método fue capaz de separar aún más las variantes de carga en sitios de desamidación específicos del sitio. Después de la desglicosilación, también se identificaron picos de succinimida adicionales, como se muestra en la FIGURA 14C y 14D.

20 Se llevó a cabo un análisis de variante cargada enriquecida diferente en otro anticuerpo como se muestra en la FIGURA 15. El principio activo de anticuerpo se comparó a una fracción de especie ácida total. El conjunto ácido total consta de variantes ácidas tal como desamidación, glicación/glucuronilación y ácido siálico (NeuAc), como se muestra en la FIGURA 15A. Las variantes ácidas se podrían separar además en sitios de desamidación específicos del sitio. Después de la desglicosilación, se observó una resolución adicional de las especies de HMW, como se muestra en la FIGURA 15B

25 Una segunda aplicación explorada fue el uso de AEX-MS para el monitoreo de atributos de Fc de alta resolución. Después de la desglicosilación, AEX-MS puede monitorear simultáneamente los estados de glicosilación, las lisinas C-terminales, y la desamidación específica de sitio, como se ilustra en la FIGURA 16. Debido a que la región Fc de los anticuerpos relacionados, por ejemplo, IgG4, se comparte, el análisis de los atributos de Fc proporciona información representativa sobre un amplio intervalo de anticuerpos. Un análisis de ejemplo de una variedad de proteínas se muestra en la FIGURA 17A y 17B, con diferentes picos que representan variantes en la glicosilación, lisinas C-terminales y desamidación específica de sitio. Se demostró que el método es ampliamente aplicable a los anticuerpos de IgG4.

35 Este análisis se aplicó adicionalmente para monitorear muestras de estabilidad, como

se muestra en la FIGURA 18. Un AEX-TIC que muestra una separación de especies de anticuerpos modificados se muestra en la FIGURA 18A, con dos trazas superpuestas que indican una muestra sin tratamiento previo (en negro, traza inferior) y una muestra estresada (en rojo, traza superior). La muestra estresada se almacenó a 25° C durante 6 meses antes del análisis. La abundancia de diferentes especies cargadas se puede comparar y cuantificar como se muestra en la FIGURA 18B. En este ejemplo, el uso del método de AEX-MS de la presente invención permitió el descubrimiento de que las variantes ácidas del anticuerpo (ver, por ejemplo, A1) aumentaron después del estrés térmico. El sitio de desamidación específico del sitio A1 probablemente se correlaciona con VSNK con base en estudios anteriores.

Una aplicación adicional explorada es el uso de AEX-MS para monitorear Fc y el intercambio de Fc* en un anticuerpo biespecífico. Se conoce que IgG4 puede experimentar un rápido intercambio de Fc después de remover los enlaces disulfuro de bisagra. Para un bsAb, el Fc y el Fc* se intercambiarán en una relación de 1:2:1 de productos de Fc*/Fc* : Fc*/Fc : Fc/Fc después de la digestión con FabRICATOR^{MR}, como se ilustra en la FIGURA 19. El método de AEX-MS de la presente invención se aplicó a una digestión de bsAb FaBRICATOR^{MR} y demostró ser suficientemente sensible para detectar el intercambio de Fc y separar las especies de Fc en la relación prevista de 1:2:1 como se muestra en la FIGURA 20. En este ejemplo, Fc* exhibió una lisina C-terminal mucho mayor en comparación a Fc.

Se ha desarrollado un método de AEX-MS nativo basado en gradiente de sal que se puede aplicar potencialmente a un intervalo de análisis de proteínas, incluyendo el análisis de variantes de carga de mAb con pI relativamente bajos. El perfil de separación de AEX y la resolución de los mAb se pueden mejorar adicionalmente por desglicosilación. AEX es muy sensible a los estados de glicosilación, así como a la lisina C-terminal y la desamidación. Las variantes básicas comunes observadas en AEX-MS incluyen lisina C-terminal, variantes no glicosiladas o parcialmente glicosiladas y succinimida. Las variantes ácidas comunes observadas en AEX-MS incluyen NeuAc, desamidación, glicación y glucuronilación.

AEX se puede utilizar ortogonalmente para la caracterización en profundidad de muestras de variantes de carga enriquecidas en la etapa de BLA. AEX-MS también se puede utilizar para el monitoreo de atributos de Fc de alta resolución, y en particular para monitorear desamidaciones específicas de sitio.