

ANÁLISIS DE VARIANZA DE SECUENCIA MEJORADO POR PROTEOMINER

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente reivindica prioridad y beneficio de la solicitud de patente provisional N° 63/297,822, presentada el 10 de enero de 2022, la solicitud de patente provisional estadounidense N° 63/426,199, presentada el 17 de noviembre de 2022, y la solicitud de patente provisional estadounidense N° 63/433,106, presentada el 16 de diciembre de 2022, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

CAMPO

[0002] La presente invención generalmente se refiere a métodos para identificar y cuantificar proteínas de células hospedadoras (HCP) de baja abundancia para monitorear y controlar impurezas en productos biofarmacéuticos. La presente invención también se refiere a métodos para enriquecer, identificar y cuantificar proteínas variantes de secuencia de aminoácidos (VS) en productos biofarmacéuticos.

ANTECEDENTES

[0003] La tecnología del ADN recombinante se ha utilizado ampliamente para producir productos biofarmacéuticos en células hospedadoras. Los productos biofarmacéuticos deben cumplir estándares de pureza muy elevados. Por lo tanto, puede ser importante controlar cualquier impureza en dichos productos biofarmacéuticos en diferentes etapas de desarrollo, producción, almacenamiento y manipulación del fármaco. Las impurezas residuales deben estar en un nivel bajo aceptable antes de realizar estudios clínicos. Las impurezas residuales también son una preocupación para los productos biofarmacéuticos destinados a los usuarios finales. Por ejemplo, las proteínas de la célula hospedadora (HCP) pueden estar presentes en productos biofarmacéuticos basados en proteínas que se desarrollan utilizando sistemas basados en células. La presencia de HCP en productos farmacéuticos debe ser monitoreada y puede ser inaceptable por encima de determinado umbral, dependiendo del producto y de la HCP particular. A veces, incluso cantidades mínimas de HCP pueden provocar una respuesta inmunogénica.

[0004] Se han utilizado inmunoensayos para monitorear la eliminación de HCP

utilizando anticuerpos policlonales anti-HCP. Los inmunoensayos pueden proporcionar una semicuantificación de los niveles totales de HCP con un alto rendimiento, pero pueden no ser efectivos para cuantificar rápidamente las HCP individuales. Recientemente ha surgido la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) para monitorear la eliminación de HCP. Sin embargo, los enormes rangos dinámicos de concentración de HCP en presencia de una alta concentración de anticuerpos purificados pueden ser un desafío para el desarrollo de métodos LC-MS para monitorear la eliminación de HCP. En particular, cuantificar las HCP individuales en niveles extremadamente bajos (<1 ppm) es un desafío.

10 [0005] Se reconocerá que existe una necesidad de métodos y sistemas para identificar y cuantificar las HCP para monitorear y controlar las HCP residuales en una sustancia farmacológica u otro producto para mitigar los riesgos de seguridad.

[0006] Las variantes de secuencia (VS) resultantes de sustituciones no deseadas de aminoácidos en proteínas terapéuticas recombinantes han atraído cada vez más la atención tanto de los organismos reguladores como de la industria biofarmacéutica, dado el impacto potencial sobre la eficacia y la seguridad. Con sistemas de producción bien optimizados, estas variantes de secuencia generalmente existen en niveles muy bajos en los productos finales debido a la alta fidelidad de los procesos de replicación del ADN y biosíntesis de proteínas en sistemas de expresión de mamíferos como las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO). Sin embargo, los niveles de VS pueden elevarse significativamente en los casos en que la línea celular de producción seleccionada tiene mutaciones inesperadas en el ADN o el proceso de fabricación no está completamente optimizado, por ejemplo, si se produce un agotamiento de determinados aminoácidos en los medios de cultivo celular en biorreactores. Por lo tanto, es importante diseñar e implementar una estrategia efectiva de monitoreo y control para prevenir o minimizar los posibles riesgos de VS durante la etapa inicial del desarrollo de productos y procesos. Sin embargo, no existe una guía bien establecida por parte de los organismos reguladores ni un consenso en toda la industria para evaluar y gestionar los riesgos de VS.

30 [0007] La industria biofarmacéutica actualmente apunta a un límite de control general del 0,1% de variación de secuencia de aminoácidos individuales en anticuerpos monoclonales (mAb) terapéuticos, que parece ser el límite superior de

variación de secuencia natural de aminoácidos individuales. Sin embargo, no existe un método sensible, exacto y preciso para detectar proteínas VS. Por ejemplo, tres laboratorios independientes digirieron mAb estándar del NIST, purificaron los péptidos trípticos de mAb del NIST utilizando columnas LC híbridas de superficie de carga de flujo regular (CSH) y detectaron péptidos trípticos de mAb del NIST VS mediante espectrometría de masas (Zhang, *et ál.* 2020). Cada uno de los tres laboratorios identificó entre 21 y 23 variaciones de secuencia en el anticuerpo monoclonal (mAb) del NIST a una tasa de entre 0,01% y 0,1%, pero los laboratorios solo estuvieron de acuerdo con respecto a 12 variaciones de secuencia. Existe la necesidad de métodos más reproducibles y confiables para detectar la gama completa de proteínas VS dentro de las terapias biofarmacéuticas, especialmente con una variación de secuencia del 0,1% para aminoácidos individuales como límite superior de impureza.

[0008] Se reconocerá que existe una necesidad de métodos y sistemas para identificar y cuantificar variaciones de secuencia de aminoácidos dentro de la bioterapéutica para garantizar la seguridad, consistencia y eficacia del producto farmacéutico.

COMPENDIO

[0009] La identificación de impurezas de HCP en productos biofarmacéuticos es un desafío debido al amplio rango dinámico de concentraciones de proteínas en muestras con muy alta complejidad. En particular, la presencia de al menos una proteína o péptido de alta abundancia en una muestra, como una proteína terapéutica, crea obstáculos técnicos para la detección, identificación y cuantificación de proteínas de muy baja abundancia en una muestra. La presente solicitud proporciona métodos para identificar impurezas de HCP en una muestra que contiene proteínas de alta abundancia, incluido un método de enriquecimiento para satisfacer la necesidad de enriquecer HCP de baja abundancia en productos farmacéuticos terapéuticos.

[0010] Esta divulgación proporciona métodos para identificar y/o cuantificar impurezas de HCP en una muestra. En algunas modalidades ilustrativas, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra que incluye al menos un péptido o proteína de alta abundancia y al menos una impureza de HCP con un soporte sólido, donde dicho soporte sólido está unido a ligandos peptídicos que interactúan capaces de interactuar con dicha al menos una impureza HCP; (b) lavar dicho soporte sólido

para proporcionar un eluido que comprende al menos una impureza de HCP enriquecida; (c) someter dicho eluido a una condición de digestión enzimática para generar al menos un componente de dicha al menos una impureza de HCP enriquecida, donde dicha condición de digestión enzimática no digiere completamente
5 todas las proteínas en dicho eluido; (d) identificar dicho al menos un componente de dicha al menos una impureza de HCP enriquecida usando un espectrómetro de masas; y (e) usar la identificación de dicho al menos un componente para identificar dicha al menos una impureza de HCP enriquecida.

[0011] En un aspecto, la etapa de lavado incluye un tensioactivo, donde dicho
10 tensioactivo es un tensioactivo de transferencia de fase, un tensioactivo iónico, un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico o combinaciones de estos. En un aspecto específico, el tensioactivo es desoxicolato de sodio, laurilsulfato de sodio, dodecylbencenosulfonato de sodio o combinaciones de estos. En otro aspecto, la concentración del tensioactivo es de aproximadamente 12 mM. En un aspecto
15 específico, el tensioactivo comprende aproximadamente 12 mM de desoxicolato de sodio y aproximadamente 12 mM de lauril sulfato de sodio.

[0012] En un aspecto, una concentración de al menos un péptido o proteína de alta abundancia es al menos aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 10.000 veces, aproximadamente 100.000 veces o aproximadamente 1.000.000 de veces
20 mayor que una concentración de dicha al menos una impureza de HCP. En otro aspecto, los ligandos peptídicos que interactúan son una biblioteca de ligandos hexapeptídicos combinatorios. En otro aspecto más, al menos un péptido o proteína de alta abundancia es un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de anticuerpo, una región Fab de un anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco, una
25 proteína de fusión, una proteína recombinante, un producto farmacéutico proteico, un producto biofarmacéutico o un medicamento.

[0013] En un aspecto, una enzima de la condición de digestión enzimática es tripsina. En un aspecto específico, la condición de digestión enzimática incluye tripsina en una proporción de enzima a sustrato de menos de aproximadamente 1:200. En
30 otro aspecto específico, la condición de digestión enzimática incluye tripsina en una proporción de enzima a sustrato de aproximadamente 1:400, aproximadamente 1:1000, aproximadamente 1:2500 o aproximadamente 1:10000. En otro aspecto, al

menos una impureza de HCP enriquecida no se somete a desnaturalización antes de someterse a dicha condición de digestión enzimática.

[0014] En un aspecto, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas de ionización por electropulverización, un espectrómetro de masas de ionización por nanoelectropulverización o un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, donde el espectrómetro de masas está acoplado a un sistema de cromatografía líquida. En otro aspecto, el espectrómetro de masas es capaz de realizar análisis LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas) o LC-MRM-MS (cromatografía líquida-monitoreo de reacciones múltiples-espectrometría de masas).

[0015] En un aspecto, el método comprende además cuantificar al menos una impureza de HCP enriquecida usando dicho espectrómetro de masas, donde un límite de detección de al menos una impureza de HCP enriquecida es aproximadamente 0,003-0,006 ppm.

[0016] Los métodos de detección similares existentes no pueden detectar la misma diversidad de variaciones de secuencia de aminoácidos dentro del mismo estándar de mAb del NIST (Zhang, *et ál.* 2020). Una posible explicación puede ser que pueden ocurrir sustituciones aberrantes de aminoácidos en cualquier aminoácido dentro de la secuencia de una proteína, creando una amplia gama de variaciones de secuencia que evaden una identificación confiable. Por lo tanto, no es posible cuantificar los riesgos asociados con las proteínas VS en general, así como con las proteínas VS específicas o subconjuntos de proteínas VS, utilizando los métodos existentes. La presente solicitud presenta un método que puede identificar aproximadamente cuatro veces más variaciones de secuencia dentro del mismo estándar de mAb del NIST que múltiples estudios anteriores. Además, los métodos de la presente divulgación son particularmente adecuados para identificar de manera reproducible variaciones en la secuencia de aminoácidos que probablemente afecten la estructura tridimensional de la proteína. Específicamente, el método de identificación VS ProteoMiner™ de la presente divulgación enriquece de manera más efectiva las proteínas VS en las que un aminoácido con una característica física, como la cadena lateral polar cargada negativamente del ácido glutámico, reemplaza un aminoácido con una característica física diferente, como la Cadena lateral hidrofóbica

no polar de valina.

[0017] La presente divulgación proporciona métodos para identificar péptidos o proteínas de VS en una muestra, donde al menos un aminoácido de un péptido o proteína VS difiere involuntariamente de un péptido o proteína de tipo silvestre. En algunas modalidades, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra que incluye al menos un péptido o proteína de tipo silvestre más abundante y al menos un péptido o proteína VS con un soporte sólido, donde el soporte sólido está unido a ligandos peptídicos que interactúan capaces de interactuar con al menos un péptido o proteína VS; (b) lavar el soporte sólido para proporcionar un primer eluido que comprende al menos un péptido o proteína VS enriquecido; (c) someter el primer eluido a una condición de digestión enzimática para generar al menos un componente de al menos un péptido o proteína VS enriquecido; (d) someter el primer eluido con al menos un componente de al menos un péptido o proteína VS enriquecido a un sistema de cromatografía líquida para producir un segundo eluido con al menos un componente de al menos un péptido o proteína VS enriquecido; (e) someter el segundo eluido con al menos un componente de al menos un péptido o proteína VS enriquecido a espectrometría de masas; (f) identificar al menos un componente de al menos un péptido o proteína VS enriquecido usando un espectrómetro de masas; y (g) usar la identificación de al menos un componente de al menos un péptido o proteína VS enriquecido para identificar al menos un péptido o proteína VS enriquecido en la muestra.

[0018] En un aspecto, la condición de digestión enzimática es una digestión directa.

[0019] En un aspecto, el sistema de cromatografía líquida comprende una columna de cromatografía líquida a nanoescala (nanoLC) o una columna CSH de flujo regular.

[0020] En un aspecto, la condición de digestión enzimática no digiere completamente todas las proteínas en el primer eluido.

[0021] En un aspecto, el soporte sólido se lava usando un tensioactivo, donde el tensioactivo es un tensioactivo de transferencia de fase, un tensioactivo iónico, un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico o combinaciones de estos.

[0022] En un aspecto, el tensioactivo es desoxicolato de sodio, laurilsulfato de

sodio, dodecilbencenosulfonato de sodio o combinaciones de estos.

[0023] En un aspecto, la concentración del tensioactivo es de aproximadamente 12 mM.

[0024] En un aspecto, el tensioactivo comprende aproximadamente 12 mM de desoxicolato de sodio y aproximadamente 12 mM de lauril sulfato de sodio.

[0025] En un aspecto, una concentración de al menos un péptido o proteína de tipo silvestre más abundante es al menos aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 10.000 veces, aproximadamente 100.000 veces o aproximadamente 1.000.000 de veces mayor que una concentración de al menos un péptido o proteína VS.

[0026] En un aspecto, los ligandos peptídicos que interactúan son una biblioteca de ligandos hexapeptídicos combinatorios.

[0027] En un aspecto, al menos un péptido o proteína de tipo silvestre más abundante y al menos un péptido o proteína VS son un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de anticuerpo, una región Fab de un anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco, una proteína de fusión, una proteína recombinante, un producto farmacéutico proteico, un producto biofarmacéutico o un medicamento.

[0028] En un aspecto, una enzima de la condición de digestión enzimática es tripsina.

[0029] En un aspecto, la condición de digestión enzimática incluye tripsina en una proporción de enzima a sustrato de menos de aproximadamente 1:200.

[0030] En un aspecto, la condición de digestión enzimática incluye tripsina en una proporción de enzima a sustrato de aproximadamente 1:400, aproximadamente 1:1000, aproximadamente 1:2500 o aproximadamente 1:10000.

[0031] En un aspecto, al menos un péptido o proteína VS enriquecido no se somete a desnaturalización antes de someterse a la condición de digestión enzimática.

[0032] En un aspecto, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas de ionización por electropulverización, un espectrómetro de masas de ionización por nanoelectropulverización o un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, donde el espectrómetro de masas está acoplado al sistema de cromatografía líquida.

[0033] En un aspecto, el espectrómetro de masas es capaz de realizar análisis LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas) o LC-MRM-MS (cromatografía líquida-monitoreo de reacciones múltiples-espectrometría de masas).

5 [0034] En un aspecto, el método comprende además cuantificar al menos un péptido o proteína VS enriquecido usando el espectrómetro de masas, donde un límite de detección de al menos un péptido o proteína VS enriquecido es aproximadamente 0,003-0,006 ppm.

[0035] La presente divulgación proporciona métodos para identificar impurezas de proteína de la célula hospedadora (HCP) en una muestra. En algunas modalidades,
10 el método comprende: (a) poner en contacto una muestra que incluye al menos un péptido o proteína de alta abundancia y al menos una impureza de HCP con un soporte sólido, donde dicho soporte sólido está unido a ligandos peptídicos que interactúan capaces de interactuar con dicha al menos una impureza HCP; (b) lavar dicho soporte sólido para proporcionar un eluido que comprende al menos una
15 impureza de HCP enriquecida; (c) someter dicho eluido a una condición de digestión enzimática para generar al menos un componente de dicha al menos una impureza de HCP enriquecida, donde dicha condición de digestión enzimática no digiere completamente todas las proteínas en dicho eluido; (d) identificar dicho al menos un componente de dicha al menos una impureza de HCP enriquecida usando monitoreo
20 de reacción en paralelo-espectrometría de masas; y (e) usar la identificación de dicho al menos un componente para identificar dicha al menos una impureza de HCP enriquecida.

[0036] En un aspecto, el soporte sólido se lava usando un tensioactivo, donde el tensioactivo es un tensioactivo de transferencia de fase, un tensioactivo iónico, un
25 tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico o combinaciones de estos.

[0037] En otro aspecto, el tensioactivo es desoxicolato de sodio, laurilsulfato de sodio, dodecibencenosulfonato de sodio o combinaciones de estos.

[0038] En un aspecto, la concentración del tensioactivo es de aproximadamente 12 mM.

30 [0039] En aun otro aspecto, el tensioactivo comprende aproximadamente 12 mM de desoxicolato de sodio y aproximadamente 12 mM de lauril sulfato de sodio.

[0040] En un aspecto, una concentración de al menos un péptido o proteína de

alta abundancia es al menos aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 10.000 veces, aproximadamente 100.000 veces, aproximadamente 1.000.000 veces, aproximadamente 10.000.000 veces, aproximadamente 100.000.000 veces o aproximadamente 1.000.000.000 veces mayor que una concentración de dicha al
5 menos una impureza de HCP.

[0041] En un aspecto, los ligandos peptídicos que interactúan son una biblioteca de ligandos hexapeptídicos combinatorios.

[0042] En un aspecto, al menos un péptido o proteína de alta abundancia es un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de anticuerpo, una región Fab
10 de un anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco, una proteína de fusión, una proteína recombinante, un producto farmacéutico proteico o un medicamento.

[0043] En un aspecto, una enzima de dicha condición de digestión enzimática es tripsina.

[0044] En otro aspecto, la condición de digestión enzimática incluye tripsina en
15 una proporción de enzima a sustrato de menos de aproximadamente 1:200.

[0045] En aun otro aspecto, la condición de digestión enzimática incluye tripsina en una proporción de enzima a sustrato de aproximadamente 1:400, aproximadamente 1:1000, aproximadamente 1:2500 o aproximadamente 1:10000.

[0046] En un aspecto, al menos una impureza de HCP enriquecida no se
20 somete a desnaturalización antes de someterse a dicha condición de digestión enzimática.

[0047] En un aspecto, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas de ionización por electropulverización, un espectrómetro de masas de ionización por nanoelectropulverización o un espectrómetro de masas de triple
25 cuadrupolo, donde el espectrómetro de masas está acoplado a un sistema de cromatografía líquida.

[0048] En un aspecto, la muestra incluye un estándar interno.

[0049] En otro aspecto, el estándar interno está marcado con un isótopo pesado.

30 [0050] En aun otro aspecto, el estándar interno es hPLBD2.

[0051] Estos y otros aspectos de la presente invención se observarán y comprenderán mejor al considerarse junto con la siguiente descripción y los dibujos

adjuntos. Si bien la siguiente descripción indica diversas modalidades y muchos de sus detalles específicos, se brinda a modo ilustrativo y no taxativo. Pueden realizarse diversas sustituciones, modificaciones, adiciones o reorganizaciones dentro del alcance de la presente invención.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0052] La FIG. 1 ilustra un flujo de trabajo del método de la presente invención, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

10 [0053] La FIG. 2 muestra la cantidad de proteínas HCP y UPS2 identificadas mediante métodos alternativos de digestión limitada de ProteoMiner™, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0054] La FIG. 3 muestra la cantidad de proteínas HCP y UPS2 identificadas mediante el método de digestión limitada ProteoMiner™ con un rango de proporciones de tripsina a sustrato, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

15 [0055] La FIG. 4 muestra la cantidad de proteínas HCP y UPS2 identificadas mediante el método de digestión limitada ProteoMiner™ con SDC/SLS presentado en un rango de 2,4 mM a 12 mM, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0056] La FIG. 5 muestra las proteínas UPS2 identificadas mediante el método ProteoMiner™ descrito anteriormente, el método de digestión limitada optimizada y el
20 método de digestión limitada ProteoMiner™ de la presente invención, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0057] La FIG. 6 muestra la cantidad de HCP identificadas mediante el método de digestión limitada ProteoMiner™ optimizada de la presente invención en comparación con los métodos convencionales, de acuerdo con una modalidad
25 ilustrativa.

[0058] La FIG. 7 muestra la cantidad de proteínas UPS2 identificadas mediante el método de digestión limitada ProteoMiner™ optimizada de la presente invención en comparación con los métodos convencionales, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

30 [0059] La FIG. 8 muestra la cantidad de HCP de anticuerpos monoclonales (mAb) NIST identificados mediante el método de digestión limitada ProteoMiner™ optimizada de la presente invención en comparación con métodos publicados

anteriormente, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0060] La FIG. 9 ilustra un flujo de trabajo de preparación de muestras para ProteoMiner™ y un método de cuantificación ultrasensible para una detección mejorada de proteínas de la célula hospedadora, de acuerdo con una modalidad
5 ilustrativa.

[0061] La FIG. 10A muestra una comparación de la cuantificación dirigida (PRM) de GLGDVDQLVK de LPL en mAb-1 y mAb-1 con el estándar recombinante correspondiente añadido en el nivel del límite inferior de cuantificación (LLOQ), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

10 [0062] La FIG. 10B muestra una comparación de la cuantificación dirigida (PRM) de EFSHITFLTIK de carboxipeptidasa en mAb-1 y mAb-1 con el estándar recombinante correspondiente añadido en el nivel del límite inferior de cuantificación (LLOQ), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0063] La FIG. 10C muestra una comparación de la cuantificación dirigida
15 (PRM) de VNVYTSHSPAGTSVQNLR de LAL en mAb-1 y mAb-1 con el estándar recombinante correspondiente añadido en el nivel del límite inferior de cuantificación (LLOQ), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0064] La FIG. 10D muestra una comparación de la cuantificación dirigida
20 (PRM) de VSSLPSVTLK de catepsina D en mAb-1 y mAb-1 con el estándar recombinante correspondiente añadido en el nivel del límite inferior de cuantificación (LLOQ), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0065] La FIG. 10E muestra una comparación de la cuantificación dirigida
25 (PRM) de GVNYASITR de catepsina Z en mAb-1 y mAb-1 con el estándar recombinante correspondiente añadido en el nivel del límite inferior de cuantificación (LLOQ), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0066] La FIG. 11A muestra la curva estándar para ocho péptidos, de acuerdo con una modalidad ilustrativa. La relación del área máxima (PAR) se calculó de acuerdo con el área máxima elegida para cada HCP dividida entre el área máxima del péptido de hPLBD2 del análisis PRM. Las HCP se añadieron a mAb-1. La lista de
30 péptidos de HCP y hPLBD2 se muestra en la **Tabla 4**.

[0067] La FIG. 11B muestra la curva estándar de relación del área máxima (PAR) para dos péptidos elegidos para LAL y PPT-1 humano, dividida entre el péptido

de hPLBD2 del análisis PRM, de acuerdo con una modalidad ilustrativa. Se agregaron LAL y PPT-1 humano a mAb-2.

[0068] La FIG. 12A muestra el perfil de degradación de PS80 observado en mAb-3 (1,28 ppm de LAL y 0,2 ppm de LPL presentes) en condiciones normales de almacenamiento (4°C-8°C) durante hasta 6 meses, basándose en mediciones de LC-CAD, de acuerdo con una modalidad ilustrativa

[0069] La FIG. 12B muestra el aumento de la concentración de ácido oleico observado en mAb-3 (1,28 ppm de LAL y 0,2 ppm de LPL presentes) en condiciones de almacenamiento normales (4°C-8°C), en base a mediciones de ácidos grasos libres, de acuerdo con una modalidad ilustrativa

[0070] La FIG. 12C muestra correlaciones entre el aumento de ácido oleico por día en condiciones de estrés (37°C) y las concentraciones de lipasa (LAL y LPL) en mAb-3 a mAb-10, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0071] La FIG. 13 muestra correlaciones entre el aumento de ácido oleico por día en condiciones de estrés (37°C) y las concentraciones de CES medidas en mAb-12 a mAb-17, de acuerdo con una modalidad ilustrativa. Las concentraciones de CES en mAb-15 a mAb-17 se cuantificaron mediante comparación de la abundancia relativa de CES con respecto a mAb-13 y mAb-14.

[0072] La FIG. 14 muestra la correlación entre el PS80% restante en condiciones de almacenamiento (4-8°C) para mAb-18, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0073] La FIG. 15A muestra el truncamiento de MY en condiciones de estrés (45°C) observadas para DS-1, DS-2 y DS-3 hasta 6 meses, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0074] La FIG. 15B muestra las concentraciones de catepsina D en DS-1, DS-2 y DS-3, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0075] La FIG. 16 muestra que los mecanismos potenciales para producir proteínas VS pueden ocurrir durante la replicación, transcripción, traducción o una combinación de estas, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0076] La FIG. 17 ilustra un flujo de trabajo del método de detección de proteínas VS mejorado de la presente invención, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0077] La FIG. 18A muestra una tabla de sustituciones de aminoácidos identificadas en mAb NIST VS usando el método de identificación ProteoMiner™ VS de la presente divulgación con columnas nanoLC o digestiones directas con columnas nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

5 [0078] La FIG. 18B muestra una tabla de sustituciones de aminoácidos identificadas en mAb NIST VS usando el método de identificación ProteoMiner™ VS de la presente divulgación con columnas nanoLC o digestiones directas con columnas nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0079] La FIG. 18C muestra una tabla de sustituciones de aminoácidos
10 identificadas en mAb NIST VS usando el método de identificación ProteoMiner™ VS de la presente divulgación con columnas nanoLC o digestiones directas con columnas nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0080] La FIG. 19A muestra una tabla de los péptidos mAb NIST VS enriquecidos identificados usando el método de enriquecimiento de VS ProteoMiner™
15 de la presente divulgación, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0081] La FIG. 19B muestra una vista de las variaciones de la secuencia de aminoácidos del mAb NIST enriquecidas usando el método de identificación ProteoMiner™ VS de la presente divulgación dentro de la estructura proteica tridimensional de un mAb NIST VS, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

20 [0082] La FIG. 19C muestra una vista alternativa de las variaciones de la secuencia de aminoácidos del mAb NIST enriquecidas usando el método de identificación ProteoMiner™ VS de la presente divulgación dentro de la estructura proteica tridimensional de un mAb NIST VS, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0083] La FIG. 19D muestra otra vista alternativa de las variaciones de la
25 secuencia de aminoácidos del mAb NIST VS identificadas usando el método de identificación ProteoMiner™ VS de la presente divulgación dentro de la estructura proteica tridimensional de un mAb NIST VS, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0084] La FIG. 20A muestra las diferentes propiedades de la histidina (*p.ej.*, cadena lateral cargada positivamente), la asparagina (*p.ej.*, cadena lateral polar no
30 cargada) y el ácido aspártico (*p.ej.*, cadena lateral cargada negativamente) responsable de las variaciones de secuencia de histidina a asparagina o ácido aspártico que afectan las estructuras proteicas de mAb de VS enriquecidos por el

método de identificación de ProteoMiner™ VS de la presente divulgación, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0085] La FIG. 20B muestra las variaciones en la secuencia de codones que pueden provocar variaciones de secuencia de histidina a asparagina o ácido aspártico en mAb de VS enriquecidos mediante el método de identificación de ProteoMiner™ VS de la presente divulgación, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0086] La FIG. 20C muestra las variaciones de secuencia de histidina a asparagina o ácido aspártico de mAb de NIST identificadas usando eluidos de digestiones directas de mAb de NIST sometidos a columnas CSH LC o nanoLC de flujo regular o digestiones de mAb de NIST enriquecidos con ProteoMiner™ sometidas a columnas de nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0087] La FIG. 20D muestra el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico detectados en un eluido de una digestión directa de mAb de NIST sometida a una columna de LC CSH de flujo regular (inferior), y el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico de histidina a asparagina VS detectados en un eluido de una digestión de mAb NIST enriquecido con ProteoMiner™ sometido a una columna nanoLC (superior), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0088] La FIG. 20E muestra el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico detectados en un eluido de una digestión directa de mAb de NIST sometida a una columna de LC CSH de flujo regular (inferior), y el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico de histidina a ácido aspártico VS detectados en un eluido de una digestión de mAb NIST enriquecido con ProteoMiner™ sometido a una columna nanoLC (superior), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0089] La FIG. 20F muestra las variaciones de secuencia de histidina a asparagina o ácido aspártico de mAb de IgG1 CHO identificadas usando eluidos de digestión directa de IgG1 CHO sometidos a columnas CSH LC de flujo regular o digestiones de mAb de IgG1 CHO enriquecidos con ProteoMiner™ sometidas a columnas de nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0090] La FIG. 21A muestra las propiedades similares de la serina (por ejemplo, cadena lateral polar no cargada) y la asparagina (por ejemplo, cadena lateral polar no cargada) que evitan que las variaciones de secuencia de serina a asparagina afecten las estructuras proteicas de los mAb VS no enriquecidos por el método de

identificación mejorado ProteoMiner™ VS de la presente divulgación, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0091] La FIG. 21B muestra las variaciones de secuencia de serina a asparagina de mAb NIST identificadas usando eluidos de digestiones directas de mAb de NIST sometidos a columnas CSH LC o nanoLC de flujo regular o eluidos de mAb de NIST ProteoMiner™ digeridos sometidos a columnas de nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0092] La FIG. 22A muestra la cantidad de variaciones de secuencia de aminoácidos mAb de NIST identificadas ($SVA > 0,01\%$) usando eluidos de digestiones directas de mAb de NIST sometidas a columnas CSH LC o nanoLC de flujo regular o digestiones de mAb de NIST con ProteoMiner™ sometidas a columnas de nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0093] La FIG. 22B muestra el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tróptico detectados en un eluido de una digestión directa de mAb de NIST sometida a una columna de LC CSH de flujo regular (inferior), y el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tróptico de glicina a ácido aspártico VS detectados (SVA tan bajo como $0,004\%$) en un eluido de una digestión de mAb NIST con ProteoMiner™ sometido a una columna nanoLC (superior), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0094] La FIG. 22C muestra la cantidad de variaciones de secuencia de serina, glicina o valina de mAb NIST identificadas usando eluidos de digestiones directas de mAb de NIST sometidas a columnas CSH LC o nanoLC de flujo regular o eluidos de mAb de NIST ProteoMiner™ digeridos sometidos a columnas de nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0095] La FIG. 22D muestra la cantidad de variaciones de secuencia de serina, glicina o valina de mAb NIST identificadas por tres laboratorios usando eluidos de digestiones directas de mAb de NIST sometidas a columnas CSH LC de flujo regular o eluidos de mAb de NIST ProteoMiner™ digeridos sometidos a columnas de nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0096] La FIG. 22E muestra las variaciones de secuencia de alanina a treonina, glicina a ácido aspártico, serina a asparagina, valina a leucina o isoleucina, arginina a lisina y lisina a arginina de mAb NIST identificadas por tres laboratorios usando eluidos

de digestiones directas de mAb de NIST sometidas a columnas CSH LC o nanoLC de flujo regular o eluidos de mAb NIST ProteoMiner™ digeridos sometidos a columnas nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0097] La FIG. 23 muestra picos insaturados (inferior) y saturados (superior) en el espectro de masas MS2 de iones de productos de péptido tríptico (por ejemplo, VVSVLTVLHQDWLNGK y TTPPVLDSDGSFEYSK) y de iones de productos de péptido tríptico VS de serina a asparagina (por ejemplo, VVNVLTVLHQDWLNGK y TTPPVLDSDGSFEYNK) detectado en un eluido de un mAb NIST ProteoMiner™ digerido sometido a una columna nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0098] La FIG. 24 muestra que el análisis de un eluido de una digestión directa de mAb de NIST sometido a una columna CSH LC de flujo regular usando un espectrómetro de masas produce picos más grandes en el espectro de masas MS2 de iones de productos de péptido tríptico (Scan 9602, $z=3$) que en el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico VS de cisteína a serina (Scan 9515, $z=3$), mientras que el análisis de un eluido de una digestión de mAb NIST enriquecido con ProteoMiner™ sometido a una columna nanoLC utilizando un espectrómetro de masas produce picos más pequeños en el espectro de masas MS2 de iones de productos de péptido tríptico (Scan 59496, $z=3$) que en el espectro de masas MS2 de iones de productos de péptido tríptico VS de cisteína a serina (Scan 59579, $z=3$), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0099] La FIG. 25 muestra que un espectrómetro de masas no genera iones y en el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico VS de serina a leucina o isoleucina utilizando un eluido de una digestión directa de mAb NIST sometida a una columna CSH LC de flujo regular (Scan 14203, $z=4$), mientras que un espectrómetro de masas genera iones y en el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico VS de serina a leucina o isoleucina utilizando un eluido de un mAb NIST ProteoMiner™ digerido sometido a una columna nanoLC (Scan 75616, $z=4$), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0100] Para fabricar productos biofarmacéuticos, es importante obtener productos biofarmacéuticos que tengan alta pureza, ya que las HCP residuales

pueden comprometer la seguridad y estabilidad del producto. Para producir anticuerpos terapéuticos recombinantes basados en células, normalmente se han utilizado inmunoensayos, como los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), para controlar la eliminación (depuración) de HCP utilizando anticuerpos policlonales anti-HCP durante el desarrollo del proceso. ELISA puede proporcionar una semicuantificación de los niveles totales de HCP con un alto rendimiento. Sin embargo, dado que los anticuerpos policlonales anti-HCP se utilizan en ELISA para capturar, detectar y cuantificar las HCP totales, es posible que no sean eficaces para cuantificar las HCP individuales. En particular, es posible que algunas HCP no inmunogénicas o débilmente inmunogénicas no se detecten mediante ELISA.

[0101] Para identificar y cuantificar las HCP, se han utilizado varios enfoques complementarios para monitorear las HCP, como la PAGE unidimensional/bidimensional (1D/2D) o la espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC) (LC-MS/MS). Sin embargo, los amplios rangos dinámicos de concentración de HCP en presencia de altas concentraciones de anticuerpos purificados pueden ser un desafío importante para el desarrollo de métodos LC-MS para monitorear la eliminación de impurezas de HCP. La espectrometría de masas (MS) por sí sola carece de la capacidad de detectar objetivos de baja abundancia, como niveles bajos de ppm de HCP, en presencia de altas concentraciones de anticuerpos terapéuticos debido a los amplios rangos dinámicos de concentración, que pueden ser más de seis órdenes de magnitud superiores a impurezas de HCP. Para superar este problema, una estrategia puede ser resolver los péptidos coeluyentes antes del análisis de MS agregando otra dimensión de separación, como 2D-LC y/o movilidad iónica, en combinación con adquisición dependiente de datos o adquisición independiente de datos para aumentar la eficiencia de separación.

[0102] Huang *et ál.* (Huang *et ál.*, A Novel Sample Preparation for Shotgun Proteomics Characterization of HCPs in Antibodies, *Anal. Chem.* 2017, 16 de mayo; 89 (10):5436-5444) describe un método de preparación de muestras que utiliza digestión con tripsina para la caracterización proteómica de shotgun de impurezas de HCP en una muestra de anticuerpos. El método de preparación de muestras de Huang mantiene el anticuerpo casi intacto mientras se digieren las HCP. El enfoque de Huang

puede reducir el rango dinámico para la detección de HCP mediante espectrometría de masas en uno o dos órdenes de magnitud en comparación con la preparación tradicional de muestras de digestión con tripsina. Como lo demuestran los experimentos de adición de HCP, el enfoque de Huang puede detectar 0,5 ppm de HCP con un peso molecular superior a 60 kDa, como rPLBL2. Por ejemplo, se detectaron sesenta impurezas de HCP de ratón en RM 8670 (NISTmAb, estándar de anticuerpo monoclonal NIST, expresado en una línea celular murina, obtenido del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, Gaithersburg, MD) utilizando el enfoque de Huang.

- 10 [0103] Doneanu *et ál.* (Doneanu *et ál.*, Enhanced Detection of Low-Abundance Host Cell Protein Impurities in High-Purity Monoclonal Antibodies Down to 1 ppm Using Ion Mobility Mass Spectrometry Coupled with Multidimensional Liquid Chromatography, Anal. Chem. 2015 Oct 20; 87(20):10283-10291) informa la detección de impurezas de HCP de baja abundancia de hasta 1 ppm en muestras de anticuerpos
- 15 utilizando métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). El enfoque de Doneanu incluye el uso de una nueva fase estacionaria C18 modificada con superficie de carga para mitigar los desafíos de la saturación de la columna, incorporando la separación por movilidad de iones de onda viajera de los precursores de péptidos coeluidos y mejorando la eficiencia de fragmentación de los péptidos HCP
- 20 de baja abundancia al correlacionar la energía de colisión utilizada para la fragmentación del precursor con el tiempo de deriva de la movilidad. Las impurezas de HCP se pueden identificar a 10-50 ppm utilizando 2D-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento 2D) en combinación con análisis de espectrometría de masas de movilidad iónica. Sin embargo, los tiempos de ciclo para 2D-LC o 2D-HPLC pueden
- 25 ser muy largos. Además, es posible que estos métodos no sean lo suficientemente sensibles para análisis de HCP de bajo nivel, como menos de 10 ppm. Otros enfoques para identificar impurezas de HCP incluyen preparaciones de muestras para enriquecer las HCP mediante la eliminación de anticuerpos en la muestra, como el uso de purificación por afinidad o digestión limitada para eliminar los anticuerpos.
- 30 Además, el uso de anticuerpos policlonales para capturar HCP es otro enfoque común. [0104] Las técnicas analíticas necesarias para identificar impurezas de HCP enfrentan el desafío de tratar con aproximadamente 1 millón de veces más moléculas

de matriz que los analitos, por ejemplo, HCP o péptidos de HCP, debido a la muy alta complejidad de la muestra. Enriquecer las HCP a niveles compatibles con la detección es difícil, ya que las impurezas de las HCP suelen estar presentes en niveles bajos, como 1 a 100 ppm, en los productos biofarmacéuticos de proteínas. Sin conocer las
5 identidades y propiedades de las HCP, puede resultar muy difícil desarrollar un procedimiento general de preparación de muestras para enriquecer las HCP (o péptidos de HCP) o eliminar el fondo de la matriz (Doneanu *et ál.*).

[0105] Chen *et ál.* (Chen *et ál.*, Improved host cell protein analysis in monoclonal antibody products through ProteoMiner, Anal. Biochem. 2020 Dec. 1; 610:113972)
10 describe un método para enriquecer HCP usando ligandos peptídicos que interactúan, particularmente perlas ProteoMiner™. El método de la presente invención mejora el método ProteoMiner™ descrito anteriormente para el enriquecimiento, la identificación y la cuantificación de HCP.

[0106] La presente solicitud proporciona un método para enriquecer HCP
15 utilizando ligandos peptídicos que interactúan, como una biblioteca combinatoria de ligandos. En algunas modalidades ilustrativas, se usan perlas ProteoMiner™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), una biblioteca combinatoria de hexapéptidos inmovilizada en perlas, para enriquecer las HCP. Cuando las perlas conjugadas con ligando peptídico se aplican a una muestra que contiene varias especies de proteínas,
20 cada especie de proteína puede unirse a sus ligandos peptídicos que interactúan. Las HCP se unen a sus ligandos peptídicos que interactúan principalmente mediante fuerza hidrofóbica en combinación con algunas fuerzas de interacción débiles, como la interacción iónica y los enlaces de hidrógeno.

[0107] Una especie de proteína que se encuentra en gran abundancia puede
25 saturar sus ligandos peptídicos que interactúan debido a la presencia de una cantidad excesiva, ya que hay un número limitado de ligandos peptídicos que interactúan correspondientes a cada especie de proteína en la biblioteca combinatoria de ligandos. Los números limitados de ligandos peptídicos que interactúan correspondientes pueden saturarse fácilmente en presencia de una cantidad excesiva
30 de proteínas en alta abundancia. El exceso de proteínas en alta abundancia que no pueden unirse a los ligandos peptídicos que interactúan se puede eliminar de las perlas. Dado que la cantidad de proteínas de baja abundancia en la muestra es

relativamente baja en comparación con las proteínas de alta abundancia, es posible que las proteínas de baja abundancia no saturan sus correspondientes ligandos peptídicos que interactúan. Por lo tanto, las proteínas de baja abundancia pueden enriquecerse relativamente en comparación con las proteínas de alta abundancia.

- 5 Después de realizar el proceso de enriquecimiento, el amplio rango dinámico de concentraciones de proteínas se puede reducir significativamente para permitir la detección de proteínas de baja abundancia.

[0108] El amplio rango dinámico de concentraciones de proteínas se puede reducir aun más mediante una digestión limitada. Disminuir la proporción de enzima
10 digestiva a sustrato y realizar una reacción de digestión en proteínas plegadas de forma nativa en lugar de proteínas desnaturalizadas, da como resultado una digestión incompleta de las proteínas en una muestra, lo que reduce desproporcionadamente la presencia de péptidos correspondientes a una proteína de alta abundancia en la muestra, y disminuyendo así el rango dinámico de concentraciones de proteínas.

15 [0109] El método de enriquecimiento con HCP de la presente solicitud puede enriquecer y detectar proteínas de abundancia media y baja al disminuir la cantidad de proteínas de alta abundancia. El método de enriquecimiento de HCP de la presente solicitud también satisface la necesidad de enriquecer impurezas de HCP de baja abundancia en productos farmacéuticos u otras muestras de interés.

20 [0110] En algunas modalidades ilustrativas, las muestras se tratan con perlas ProteoMiner™ para reducir la cantidad de proteínas terapéuticas que están presentes en alta abundancia y para enriquecer impurezas de HCP de baja abundancia. Posteriormente, la muestra enriquecida con HCP se somete a análisis proteómico. Este procedimiento puede enriquecer las impurezas de HCP de baja abundancia y
25 reducir los niveles de proteína terapéutica al mismo tiempo. Puede reducir con éxito los rangos de concentración dinámica entre las HCP y los fármacos proteicos, lo que permite la detección de impurezas de HCP de baja abundancia. El límite de detección de las impurezas de HCP utilizando el método de enriquecimiento de HCP de la presente solicitud es de aproximadamente 0,003-0,006 ppm.

30 [0111] En algunas modalidades ilustrativas, la presente divulgación proporciona un método para identificar y/o cuantificar impurezas de proteína de la célula hospedadora (HCP) en una muestra, que comprende: poner en contacto una

muestra que incluye al menos un péptido o proteína de alta abundancia y al menos una impureza de HCP para un soporte sólido, donde dicho soporte sólido está unido a ligandos peptídicos que interactúan capaces de interactuar con dicha al menos una impureza de HCP; lavar el soporte sólido para proporcionar un eluido que comprende
5 al menos una impureza de HCP enriquecida; someter el eluido a una condición de digestión enzimática para generar al menos un componente de al menos una impureza de HCP enriquecida, donde la condición de digestión enzimática es una digestión limitada que no digiere completamente todas las proteínas en el eluido; identificar y/o cuantificar al menos un componente de al menos una impureza de HCP
10 enriquecida usando un espectrómetro de masas; y usar la identificación y/o cuantificación de al menos un componente para identificar y/o cuantificar al menos una impureza de HCP enriquecida.

[0112] En algunas modalidades ilustrativas, se usan tensioactivos de transferencia de fase (PTS), como desoxicolato de sodio (SDC) y lauril sulfato de sodio
15 (SLS), para eluir las HCP de las perlas de ProteoMiner™. SDC es un detergente iónico que es especialmente útil para interrumpir y disociar interacciones de proteínas. Los detergentes iónicos tienen un grupo principal hidrofílico que está cargado y puede tener carga negativa (aniónica) o positiva (catiónica). SLS es un tensioactivo aniónico. Los detergentes aniónicos, como el SLS o el dodecilmecenosulfonato de sodio, son
20 sales sódicas de cadena larga sulfonadas, alcoholes o hidrocarburos.

[0113] En algunas modalidades ilustrativas, el amortiguador de elución para eluir HCP de las perlas de ProteoMiner™ contiene tensioactivos iónicos, tensioactivos
aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos de transferencia de fase o combinaciones de estos. En un aspecto, el amortiguador de elución contiene SDC,
25 SLS o dodecilmecenosulfonato de sodio. En un aspecto, el amortiguador de elución comprende amortiguador PTS que contiene SDC (desoxicolato de sodio) 12 mM, SLS (lauroilsarcosinato de sodio) 12 mM, TCEP (Tris(2-carboxietil)fosfina, un agente reductor) 10 mM y CAA (cloroacetamida) 30 mM.

[0114] Pequeñas cantidades de determinados HCP pueden provocar una
30 respuesta inmunitaria o actividades biológicas tóxicas después de la inyección del fármaco. La presencia de HCP residuales en productos biofarmacéuticos es una preocupación para la seguridad de los medicamentos, lo que ha llevado a una

demanda creciente de métodos y sistemas en desarrollo para identificar y caracterizar las impurezas de HCP en productos biofarmacéuticos. Existen necesidades insatisfechas para identificar y monitorear las HCP individuales para la evaluación de riesgos en productos proteicos terapéuticos.

5 [0115] Esta divulgación proporciona métodos y sistemas para satisfacer las demandas antes mencionadas al proporcionar métodos y sistemas para identificar y cuantificar las HCP para monitorear y controlar las HCP residuales en el fármaco para mitigar los riesgos de seguridad. Las modalidades ilustrativas descritas en la presente satisfacen las demandas mencionadas anteriormente y las necesidades largamente
10 anheladas.

[0116] Además de las HCP, las variantes de secuencia (VS) resultantes de sustituciones no deseadas de aminoácidos son otro atributo de calidad del producto que preocupa en el desarrollo y la fabricación de fármacos. Se ha demostrado que dichas VS existen tanto en proteínas naturales como recombinantes, y se cree que
15 son causadas por una serie de mecanismos que incluyen mutaciones del ADN durante la replicación y errores de transcripción y traducción durante el proceso de biosíntesis de proteínas.

[0117] Debido a la alta fidelidad de los sistemas biológicos, que evolucionaron para evitar la aparición de errores espontáneos, las VS suelen estar presentes en un
20 nivel muy bajo ($<0,1\%$) en las proteínas biológicas naturales. Sin embargo, durante el desarrollo de fármacos proteicos terapéuticos, el objetivo es aumentar la titulación de proteínas y la productividad del proceso para satisfacer la demanda global y reducir el costo de los bienes para un mayor acceso de los pacientes. Esto ha llevado al amplio uso de los llamados sistemas de fabricación de biorreactores intensificados, que están
25 diseñados para maximizar la densidad celular y la productividad específica de las proteínas terapéuticas diana durante el proceso de cultivo celular. Estos sistemas de producción intensificados pueden imponer un estrés en la maquinaria de expresión superior al normal a las líneas celulares de producción. Si no se optimiza por completo, se podrían generar niveles elevados de VS en los productos proteicos. Además, para
30 aumentar aun más la titulación del producto, el desarrollo de la línea celular generalmente pasa por múltiples rondas de selección con tensiones selectivas crecientes para encontrar el clon celular con mayor producción. Este proceso de

selección podría introducir mutaciones en el ADN de las líneas celulares. Si no se analiza adecuadamente, podría generar niveles inesperadamente altos de VS en los productos farmacéuticos finales.

[0118] Dadas estas preocupaciones sobre cómo las VS elevadas podrían
5 afectar la calidad de los medicamentos, tanto la industria como las agencias reguladoras han comenzado a prestar más atención a las VS. Durante la última década, se han invertido esfuerzos y recursos sustanciales en toda la industria para comprender mejor las causas de las VS y su control en el desarrollo biológico. Como resultado de estos esfuerzos colectivos, se han desarrollado varias estrategias de
10 control para monitorear y mitigar mejor el problema de VS durante el desarrollo de productos y procesos. Como se esperaba, estas estrategias propuestas resaltaron la importancia de un enfoque de detección de VS de múltiples ensayos y niveles para guiar el desarrollo del proceso desde la selección temprana de líneas celulares hasta el desarrollo del proceso de cultivo celular a pequeña escala y la confirmación a mayor
15 escala. Juntas, estas estrategias han proporcionado un marco valioso para toda la industria y una guía de alto nivel hacia el objetivo de establecer algunas mejores prácticas comunes en términos de control de VS.

[0119] Sin embargo, todavía falta claridad y consenso en toda la industria sobre una variedad de aspectos importantes. Estos incluyen, por ejemplo: 1) la selección y
20 el uso combinado de múltiples tecnologías analíticas relevantes para VS (por ejemplo, secuenciación de ADN o ARN basada en secuenciación de última generación, cromatografía líquida (LC)-espectrometría de masas (MS)/MS, análisis de aminoácidos sustitutos); 2) la selección de etapa(s) y grado para implementar el monitoreo y control de VS durante el desarrollo del producto y proceso considerando
25 tanto la efectividad de la estrategia de control general como el cronograma de desarrollo; 3) la evaluación adecuada del riesgo de VS sobre la seguridad y eficacia del producto; 4) determinación de un límite de control racional de VS o nivel aceptable en el desarrollo de procesos y en los productos farmacéuticos finales; y 5) presentación de informes de los datos del VS en la presentación regulatoria.

30 [0120] Para llenar algunas de estas lagunas de conocimiento, el Consorcio Internacional para la Innovación y la Calidad en el Desarrollo Farmacéutico publicó recientemente los resultados de una encuesta de las prácticas de la industria sobre el

análisis y el control de VS en su desarrollo biológico. (Zhang, *et ál.* 2020). En la encuesta, una de las preguntas más críticas es el nivel de VS que las empresas individuales establecen como límite de acción (u objetivo de control) para el desarrollo de sus productos y procesos. Lo problemático es que no existe un método confiable para detectar de manera reproducible el mismo conjunto de mAb VS dentro de una muestra. Por ejemplo, un estudio anterior evaluó el rendimiento de un método LC-MS para la detección de mAb VS NIST porque estaba bien caracterizado y dos laboratorios independientes habían realizado un análisis similar. (Zhang, *et ál.* 2020). Aunque los tres laboratorios pudieron detectar e identificar VS de bajo nivel en el rango de 0,01 a 0,1 %, los conjuntos de VS identificados por los tres laboratorios no se superpusieron completamente entre sí. Cada uno de los tres laboratorios de pruebas identificó un número similar (*p.ej.*, 21-23) de VS en el mAb del NIST, pero solo 12 de ellos fueron identificados comúnmente por los tres laboratorios de pruebas, lo que sugiere que existe una gran variedad basada en métodos en la detección de VS de bajo nivel.

[0121] La presente solicitud proporciona métodos para mejorar el límite de detección de proteínas VS, particularmente mAb, con o sin enriquecimiento utilizando ligandos peptídicos que interactúan, tales como una biblioteca combinatoria de ligandos. En algunas modalidades ilustrativas, se usan perlas ProteoMiner™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), una biblioteca combinatoria de hexapéptidos inmovilizada en perlas, para mejorar el límite de detección de mAb VS (*p.ej.*, resolución a qué mAb VS se pueden detectar). En algunas modalidades ilustrativas, las perlas ProteoMiner™ pueden enriquecer mAb VS en los que una sustitución de aminoácidos afecta la estructura de la proteína mAb. Cuando las perlas conjugadas con ligando peptídico se aplican a una muestra que contiene varias especies de proteínas, cada especie de proteína puede unirse a sus ligandos peptídicos que interactúan. Las proteínas VS se unen a sus ligandos peptídicos que interactúan principalmente mediante fuerza hidrofóbica en combinación con algunas fuerzas de interacción débiles, como la interacción iónica y los enlaces de hidrógeno.

[0122] Una especie de proteína no VS de alta abundancia y su correspondiente especie de proteína VS de baja abundancia pueden unirse a los mismos ligandos peptídicos que interactúan. La afinidad de una especie de proteína VS de baja

abundancia por un ligando peptídico puede igualar la afinidad de la correspondiente especie de proteína no VS por el mismo ligando peptídico. De manera alternativa, la afinidad de una especie de proteína VS de baja abundancia por un ligando peptídico puede ser superior o inferior a la afinidad de la correspondiente especie de proteína no VS por el mismo ligando peptídico. El exceso de proteínas no VS en alta abundancia que no pueden unirse a los ligandos peptídicos que interactúan se puede eliminar de las perlas. Por lo tanto, el límite de detección de las especies de proteínas VS de baja abundancia puede mejorarse relativamente en comparación con las especies de proteínas no VS de alta abundancia. Después de mejorar el límite de detección de las especies de proteínas VS de baja abundancia, el amplio rango dinámico de concentraciones de proteínas se puede reducir significativamente para permitir la detección de proteínas VS de baja abundancia.

[0123] El amplio rango dinámico de concentraciones de proteínas se puede reducir aun más mediante una digestión limitada. Disminuir la proporción de enzima digestiva a sustrato y realizar una reacción de digestión en proteínas plegadas de forma nativa en lugar de proteínas desnaturalizadas, da como resultado una digestión incompleta de las proteínas en una muestra, lo que puede reducir desproporcionadamente la presencia de péptidos correspondientes a una proteína de alta abundancia en la muestra, y disminuye el rango dinámico de concentraciones de proteínas.

[0124] El límite de detección de especies de proteínas VS de baja abundancia se puede mejorar aun más utilizando LC de nanoflujo (nanoLC). NanoLC puede mejorar los espectros de MS2 al aumentar la señal de los iones de productos peptídicos VS que se derivan de las proteínas VS y permitir la formación de más iones y.

[0125] El método mejorado de detección de proteínas VS de la presente solicitud puede mejorar el límite de detección de proteínas VS al disminuir la cantidad de proteínas no VS de alta abundancia. El método para mejorar el límite de detección de proteínas VS de la presente solicitud también puede satisfacer la necesidad de enriquecer proteínas VS de baja abundancia en productos farmacológicos terapéuticos.

[0126] En algunas modalidades ilustrativas, las muestras se tratan con perlas

ProteoMiner™ para reducir la cantidad de proteínas terapéuticas que están presentes en gran abundancia y para mejorar la detección de proteínas terapéuticas VS de baja abundancia con o sin enriquecimiento. Posteriormente, las muestras se someten a análisis proteómico. Este procedimiento puede enriquecer las proteínas terapéuticas VS de baja abundancia y reducir los niveles de proteínas terapéuticas no VS al mismo tiempo. Puede reducir con éxito los rangos de concentración dinámica entre fármacos proteicos VS y no VS, lo que permite la detección de proteínas VS de baja abundancia. El método mejorado de detección de proteínas VS de la presente solicitud puede detectar una sustitución de aminoácidos que se produce en aproximadamente el 0,003 % de las proteínas.

[0127] En algunas modalidades ilustrativas, la presente divulgación proporciona un método para identificar péptidos o proteínas variantes de secuencia (VS) en una muestra, donde al menos un aminoácido de un péptido o proteína VS difiere involuntariamente de un péptido o proteína de tipo silvestre, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra que incluye al menos un péptido o proteína de tipo silvestre más abundante y al menos un péptido o proteína VS con un soporte sólido, donde dicho soporte sólido está unido a ligandos peptídicos que interactúan capaces de interactuar con dicho al menos un péptido o proteína VS; (b) lavar dicho soporte sólido para proporcionar un primer eluido que comprende al menos un péptido o proteína VS enriquecido; (c) someter dicho primer eluido a una condición de digestión enzimática para generar al menos un componente de dicho al menos un péptido o proteína VS enriquecido; (d) someter dicho primer eluido con dicho al menos un componente de dicho al menos un péptido o proteína VS enriquecido a un sistema de cromatografía líquida para producir un segundo eluido con dicho al menos un componente de dicho al menos un péptido o proteína VS enriquecido; (e) someter dicho segundo eluido con dicho al menos un componente de dicho al menos un péptido o proteína VS enriquecido a espectrometría de masas; (f) identificar dicho al menos un componente de dicho al menos un péptido o proteína VS enriquecido usando un espectrómetro de masas; y (g) usar la identificación de dicho al menos un componente de dicho al menos un péptido o proteína VS enriquecido para identificar dicho al menos un péptido o proteína VS enriquecido en dicha muestra.

[0128] En algunas modalidades ilustrativas, se usan tensioactivos de

transferencia de fase (PTS) para eluir proteínas VS de perlas ProteoMiner™. En algunas modalidades ilustrativas, el amortiguador de elución para eluir proteínas VS de las perlas de ProteoMiner™ contiene tensioactivos iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos de transferencia de fase o combinaciones de estos. En un aspecto, el amortiguador de elución contiene SDC, SLS o dodecilmecanosulfonato de sodio. En un aspecto, el amortiguador de elución comprende amortiguador PTS que contiene SDC (desoxicolato de sodio) 12 mM, SLS (lauroilsarcosinato de sodio) 12 mM, TCEP (Tris(2-carboxietil)fosfina, un agente reductor) 10 mM y CAA (cloroacetamida) 30 mM.

10 [0129] Pequeñas cantidades de determinadas proteínas VS pueden provocar una respuesta inmunitaria o actividades biológicas tóxicas después de la inyección del fármaco. La presencia de proteínas VS en productos biofarmacéuticos ha sido una preocupación para la seguridad de los medicamentos, lo que ha llevado a una demanda creciente de métodos y sistemas en desarrollo para identificar y caracterizar
15 las proteínas VS en productos biofarmacéuticos. Existen necesidades insatisfechas de identificar y monitorear las proteínas VS para evaluar el riesgo de la presencia de proteínas VS en productos proteicos terapéuticos.

[0130] Esta divulgación proporciona métodos y sistemas para satisfacer las demandas antes mencionadas al proporcionar métodos y sistemas para identificar y
20 cuantificar las proteínas VS para monitorear y controlar las proteínas VS en el fármaco para mitigar los riesgos de seguridad. Las modalidades ilustrativas descritas en la presente satisfacen las demandas mencionadas anteriormente y las necesidades largamente anheladas.

[0131]

25 [0132] A menos que se disponga lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que comúnmente les atribuye el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Si bien en la puesta en práctica o para la evaluación se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, a continuación, se describen
30 métodos y materiales en particular.

[0133] Debe entenderse que el término «uno/a» significa «al menos uno/a». Asimismo, debe entenderse que las expresiones «alrededor de» y

«aproximadamente» permiten una variación estándar, tal como lo comprenderán los expertos en la técnica y, cuando se proporcionen intervalos, se incluyen los valores extremos. Tal como se usa en la presente, los términos «incluyen», «incluye» y «que incluye» no pretenden ser taxativos y se entiende que significan «comprenden»,
5 «comprende» y «que comprende», respectivamente.

[0134] Tal como se usa en la presente, el término «proteína» o «proteína de interés» puede incluir cualquier polímero de aminoácido con enlaces amida unidos covalentemente. Las proteínas comprenden una o más cadenas poliméricas de aminoácidos, generalmente conocidas en la técnica como «polipéptidos».

10 «Polipéptido» se refiere a un polímero compuesto por residuos de aminoácidos; variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos y no naturales de estos, enlazados mediante enlaces peptídicos. «Péptido o polipéptido sintético» se refiere a un péptido o polipéptido de origen no natural. Los péptidos o polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante un sintetizador de
15 polipéptidos automático. Los expertos en la técnica conocen varios métodos de síntesis de péptidos en fase sólida. Una proteína puede comprender uno o múltiples polipéptidos para formar una única biomolécula funcional.

[0135] Como se usa en la presente, la expresión «proteína terapéutica» incluye cualquiera de las proteínas, proteínas recombinantes utilizadas en investigación o en
20 terapia, proteínas trap y otras proteínas de fusión del receptor quimérico Fc, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos y anticuerpos biespecíficos.

[0136] En otro aspecto ilustrativo, una proteína puede incluir fragmentos de anticuerpos, nanocuerpos, quimeras de anticuerpos recombinantes, citocinas, quimiocinas, hormonas peptídicas y similares. Las proteínas de interés pueden incluir
25 cualquiera de las proteínas bioterapéuticas, proteínas recombinantes utilizadas en investigación o en terapia, proteínas trap y otras proteínas de fusión del receptor quimérico Fc, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos y anticuerpos biespecíficos. Las
30 proteínas pueden producirse utilizando sistemas de producción a base de células recombinantes, tales como el sistema de baculovirus de insecto, sistemas de levadura (por ejemplo, *Pichia* sp.) y sistemas de mamíferos (por ejemplo, células CHO y

derivados de CHO como células CHO-K1). Para acceder a una reseña sobre las proteínas bioterapéuticas y su producción, consulte Ghaderi et ál., “Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation” (Darius Ghaderi *et ál.*, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147–176 (2012), cuya totalidad se incorpora a la presente mediante esta referencia). En algunas modalidades ilustrativas, las proteínas comprenden modificaciones, aductos y otros restos unidos covalentemente. Esas modificaciones, aductos y restos 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), epítipo myc de glutatión-S-transferasa (GST), marcadores fluorescentes y otros tintes, y similares. Las proteínas se pueden clasificar sobre la base de la composición y la solubilidad y, por tanto, pueden incluir proteínas simples, tales como proteínas globulares y proteínas fibrosas; proteínas conjugadas, tales como nucleoproteínas, glicoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, fosfoproteínas, metaloproteínas y lipoproteínas; y proteínas derivadas, tales como proteínas derivadas primarias y proteínas derivadas secundarias.

[0137] En un aspecto, al menos un péptido o proteína de alta abundancia en el método de la presente invención es un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de anticuerpo, una región Fab de un anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco, una proteína de fusión, un producto farmacéutico proteico o un medicamento.

[0138] Tal como se utiliza en la presente, el término «proteína recombinante» se refiere a una proteína producida como resultado de la transcripción y traducción de un gen transportado en un vector de expresión recombinante que se ha introducido en una célula huésped adecuada. En determinadas modalidades ilustrativas, la proteína recombinante puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o completamente humano. En determinadas modalidades ilustrativas, la proteína recombinante puede ser un anticuerpo de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en: IgG, IgM, IgA1, IgA2, IgD o IgE. En determinadas modalidades ilustrativas, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa (*p.ej.*,

una IgG1) o, alternativamente, el anticuerpo puede ser un fragmento (por ejemplo, un fragmento Fc o un fragmento Fab).

[0139] El término «anticuerpo», tal como se usa en la presente, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante 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 VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (CL1). Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En diferentes modalidades de la presente invención, las FR del anticuerpo anti-big-ET-1 (o su parte de unión al antígeno) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana o pueden estar modificadas natural o artificialmente. Es posible definir una secuencia de consenso de aminoácidos en función de un análisis comparativo de dos o más CDR. El término «anticuerpo», tal como se usa en la presente, también incluye fragmentos de unión al antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones «parte de unión al antígeno» de un anticuerpo, «fragmento de unión al antígeno» de un anticuerpo y similares, tal como se usan en la presente, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, que se pueda obtener enzimáticamente, sintético o genéticamente alterado, que se una específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas mediante cualquier técnica habitual adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de modificación genética recombinante que implican la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios variables y opcionalmente

constantes de anticuerpos. Dicho ADN se conoce y/o se encuentra fácilmente disponible, por ejemplo, a través de fuentes comerciales, bancos de ADN (incluidos, por ejemplo, bancos de anticuerpos-fagos), o puede sintetizarse. Es posible secuenciar y manipular el ADN químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para ordenar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

[0140] Tal como se usa en la presente, un «fragmento de anticuerpo» incluye una parte de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región de unión al antígeno o variable de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento scFv, un fragmento Fv, un diacuerpo dsFv, un fragmento dAb, un fragmento Fd', un fragmento Fd y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, así como triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos Fv son la combinación de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, y las proteínas ScFv son moléculas polipeptídicas de cadena sencilla recombinantes, en las que las regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina están conectadas mediante un enlazador peptídico. En algunos ejemplos de modalidades, un fragmento de anticuerpo comprende suficiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo original del cual es fragmento que se une al mismo antígeno que el anticuerpo original. En algunos ejemplos de modalidades, un fragmento se une al antígeno con una afinidad comparable a la del anticuerpo original y/o compite con el anticuerpo original por la unión al antígeno. Se puede producir un fragmento de anticuerpo a través de diversos medios. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente mediante fragmentación de un anticuerpo intacto y/o puede producirse a través de medios recombinantes a partir de un gen que codifique la secuencia parcial del anticuerpo. De manera alternativa o adicional, un fragmento de anticuerpo puede producirse a través de medios total o parcialmente sintéticos. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo de cadena simple. De manera alternativa o adicional, un fragmento de anticuerpo puede

comprender múltiples cadenas enlazadas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular. Un fragmento de anticuerpo funcional comprende típicamente al menos alrededor de 50 aminoácidos y, más típicamente, comprende al menos
5 alrededor de 200 aminoácidos.

[0141] La expresión «anticuerpo biespecífico» (bsAbs) incluye un anticuerpo capaz de unir selectivamente dos o más epítomos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas diferentes y cada cadena pesada se une específicamente a un epítomo diferente, ya sea en dos moléculas diferentes
10 (por ejemplo, antígenos) o en la misma molécula (por ejemplo, en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unir selectivamente dos epítomos diferentes (un primer epítomo y un segundo epítomo), la afinidad de la primera cadena pesada con respecto al primer epítomo será generalmente al menos uno a dos o tres o cuatro órdenes de magnitud menor que la afinidad de la primera cadena pesada con respecto
15 al segundo epítomo y viceversa. Los epítomos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma diana o en una diana diferente (por ejemplo, en la misma proteína o en una diferente). Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconozcan diferentes epítomos del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que
20 codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítomos del mismo antígeno pueden fusionarse con secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen diferentes regiones constantes de cadena pesada, y dichas secuencias pueden expresarse en una célula que exprese una cadena ligera de inmunoglobulina.

[0142] Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una
25 con tres CDR de cadena pesada, seguidas de un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, así como una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere especificidad de unión al antígeno, pero que se puede asociar con cada cadena pesada, o que se puede asociar con cada cadena pesada y que se puede unir a uno o más de los epítomos unidos por las regiones de unión al antígeno de la cadena
30 pesada, o que se puede asociar con cada cadena pesada y permitir la unión de una o ambas cadenas pesadas a uno o ambos epítomos. Los BsAb se pueden dividir en dos clases principales, los que tienen una región Fc (similar a IgG) y los que carecen de

región Fc, con esta última normalmente más pequeña que las moléculas biespecíficas de IgG y similares a IgG que comprenden una Fc. Los bsAb similares a IgG pueden tener diferentes formatos, como, entre otros, triomab, IgG de botones en ojales (kih IgG), crossMab, IgG orth-Fab, Ig con dominios de doble variable (DVD-Ig), Fab de acción doble o dual (DAF), Fv de cadena simple de IgG (IgG-scFv) o cuerpos κλ. Los diferentes formatos no similares a IgG incluyen scFv dobles, formato de diacuerpo, diacuerpo de cadena simple, diacuerpos dobles (TandAb), molécula de redireccionamiento de afinidad doble (DART), DART-Fc, nanocuerpos o anticuerpos producidos a través del método Dock and Lock (DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265–310 (2014)). Los métodos de producción de BsAb no se limitan a la tecnología de cuádrimas basada en la fusión somática de dos líneas celulares de hibridomas diferentes, la conjugación química que involucra agentes de reticulación químicos, y enfoques genéticos que utilizan tecnología de ADN recombinante.

[0143] Como se usa en la presente, la expresión «anticuerpo multiespecífico» se refiere a un anticuerpo con especificidades de unión con respecto a al menos dos antígenos diferentes. Si bien dichas moléculas normalmente solo se unen a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, bsAb), los sistemas y métodos descritos en la presente también pueden referirse a los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como el anticuerpo triespecífico y el triespecífico KIH.

[0144] Tal como se utiliza en la presente, la expresión «anticuerpo monoclonal» no se limita a los anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. Un anticuerpo monoclonal puede derivarse de un solo clon, incluido cualquier clon eucariota, procariota o fago, utilizando 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 industria, incluido el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes y de expresión de fagos o una combinación de estas.

[0145] Tal como se utiliza en la presente, la expresión «proteína de la célula

hospedadora» (HCP) incluye proteína derivada de la célula hospedadora. La proteína de célula hospedadora puede ser una impureza relacionada con el proceso que puede derivarse del proceso de fabricación y pueden incluir las tres categorías principales: derivadas del sustrato celular, derivadas del cultivo celular y derivadas en etapa posterior. Las impurezas derivadas del sustrato celular incluyen, entre otras, proteínas derivadas del organismo hospedador y ácido nucleico (ADN total, vector o genómico de la célula hospedadora). Las impurezas derivadas del cultivo celular incluyen, entre otros, inductores, antibióticos, suero y otros componentes de los medios. Las impurezas derivadas en etapa posterior incluyen, entre otros, enzimas, reactivos de procesamiento químico y bioquímico (por ejemplo, bromuro de cianógeno, guanidina, agentes oxidantes y reductores), sales inorgánicas (por ejemplo, metales pesados, arsénico, iones no metálicos), disolventes, portadores, ligandos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) y otras sustancias lixiviables. En algunas modalidades ilustrativas, los tipos de impurezas relacionadas con el proceso HCP en la composición pueden ser al menos dos.

[0146] En algunas modalidades ilustrativas, una muestra puede comprender al menos una proteína o péptido de alta abundancia y al menos un HCP. En algunas modalidades ilustrativas, una concentración de al menos un péptido o proteína de alta abundancia puede ser al menos aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 10.000 veces, aproximadamente 100.000 veces o aproximadamente 1.000.000 de veces mayor que una concentración de al menos una HCP. Otra forma de expresar las concentraciones relativas es, por ejemplo, en partes por millón (ppm). Debe entenderse que cuando se utilizan ppm para describir la concentración de una proteína o péptido de baja abundancia, como una HCP, en una muestra que incluye una proteína o péptido de alta abundancia, como una proteína terapéutica, las ppm se miden en relación con la concentración de la proteína o péptido de alta abundancia. En algunas modalidades ilustrativas, una concentración de al menos una HCP puede ser inferior a aproximadamente 1000 ppm, menos de aproximadamente 100 ppm, menos de aproximadamente 10 ppm o menos de aproximadamente 1 ppm.

[0147] Tal como se utiliza en la presente, la expresión «proteína variante de secuencia» (proteína VS) incluye cualquier proteína con un aminoácido sustituido involuntariamente. Por ejemplo, las sustituciones involuntarias de aminoácidos dentro

de las proteínas VS pueden resultar de al menos una mutación del ADN en la secuencia codificante, un error de transcripción del ADN al ARNm, un error de traducción del ARNm a la secuencia de proteína, o una combinación de estos, como se ve en la FIG. 15. Como se revisa en la literatura, debido a la fidelidad finita en el proceso de replicación del ADN y biosíntesis de proteínas, la sustitución involuntaria de aminoácidos ocurre naturalmente en cualquier sistema biológico natural de manera espontánea. Sin embargo, en los sistemas biológicos normales, se espera que la probabilidad de que ocurran errores espontáneos sea extremadamente baja, con un rango de 10^{-11} - 10^{-8} durante la replicación del ADN, 10^{-6} - 10^{-4} durante la transcripción del ARNm y 10^{-5} - 10^{-4} durante la traducción de proteínas. En sistemas procarióticos, como E. coli, el error de traducción podría ser mayor, hasta 10^{-3} , o 0,1% de VS en relación con su forma nativa. Debido a la naturaleza espontánea de los eventos, estos niveles muy bajos de VS resultantes de errores de transcripción o traducción suelen ser inevitables y, por lo tanto, pueden considerarse como el ruido biológico en la expresión de proteínas. Los sistemas de producción de proteínas recombinantes poco optimizados pueden elevar las proteínas VS, por ejemplo, al contener una secuencia de codones rara o como resultado del agotamiento de un aminoácido.

[0148] En algunas modalidades ilustrativas, una muestra puede comprender al menos una proteína o péptido no VS de alta abundancia y al menos una proteína VS.

En algunas modalidades ilustrativas, una concentración de al menos un péptido o proteína no VS de alta abundancia puede ser al menos aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 10.000 veces, aproximadamente 100.000 veces o aproximadamente 1.000.000 de veces mayor que una concentración de al menos una proteína VS. Otra forma de expresar las concentraciones relativas es, por ejemplo, en partes por millón (ppm). Debe entenderse que cuando se utilizan ppm para describir la concentración de una proteína o péptido de baja abundancia, como una proteína VS, en una muestra que incluye una proteína o péptido no VS de alta abundancia, como una proteína terapéutica, las ppm se miden en relación con la concentración de la proteína o péptido no VS de alta abundancia. En algunas modalidades ilustrativas, una concentración de al menos una proteína VS puede ser menos de aproximadamente 1000 ppm (por ejemplo, 0,1%), menos de aproximadamente 100 ppm (por ejemplo, 0,01%), menos de aproximadamente 10 ppm (por ejemplo,

0,001%), o menos de aproximadamente 1 ppm (por ejemplo, 0,0001%).

[0149] Si bien la presente divulgación se refiere principalmente a HCP y VS, debe entenderse que los métodos y sistemas de la presente invención se pueden usar para la identificación y cuantificación de cualquier péptido o proteína de baja
5 abundancia en una muestra.

[0150] Tal como se usa en la presente, un «producto farmacéutico proteico» o «producto biofarmacéutico» incluye un ingrediente activo que puede ser total o parcialmente de naturaleza biológica. En un aspecto, el producto farmacéutico proteico puede comprender un péptido, una proteína, una proteína de fusión, un
10 anticuerpo, un antígeno, una vacuna, un conjugado péptido-fármaco, un conjugado anticuerpo-fármaco, un conjugado proteína-fármaco, células, tejidos, o combinaciones de estos. En otro aspecto, el producto farmacéutico proteico puede comprender una versión recombinante, manipulada genéticamente, modificada, mutada o truncada de
15 un péptido, una proteína, una proteína de fusión, un anticuerpo, un antígeno, una vacuna, un conjugado péptido-fármaco, un conjugado anticuerpo-fármaco, un conjugado proteína-fármaco, células, tejidos, o combinaciones de estos.

[0151] Como se usa en la presente, una «muestra» se puede obtener a partir de cualquier etapa de un bioproceso, tal como, fluido de cultivo celular (CCF), fluido de cultivo de células recolectadas (HCCF), cualquier etapa en el procesamiento
20 posterior, sustancia farmacológica (DS) o un producto farmacológico (DP) que comprende el producto formulado final. En algunas modalidades ilustrativas específicas, la muestra se puede seleccionar de cualquier etapa del proceso posterior de clarificación, producción cromatográfica, o filtración. En algunas modalidades ilustrativas específicas, el producto farmacológico se puede seleccionar de un
25 producto farmacológico fabricado en la clínica, envío, almacenamiento o manipulación.

[0152] Como se usa en la presente, la expresión «soporte sólido» puede incluir cualquier superficie con la capacidad de unirse a una proteína o péptido. Ejemplos no taxativos de soportes sólidos pueden incluir resinas de afinidad, perlas y placas o
30 microplacas recubiertas. Los soportes sólidos se pueden unir a moléculas capaces de unirse a una proteína o péptido, incluidos reactivos de afinidad, moléculas de unión al antígeno o ligandos peptídicos que interactúan. En algunas modalidades ilustrativas,

un soporte sólido comprende perlas unidas a ligandos peptídicos que interactúan. En algunas modalidades ilustrativas, un soporte sólido comprende perlas de ProteoMiner™.

[0153] En algunas modalidades ilustrativas, la muestra se puede preparar antes del análisis LC-MS. Las etapas de preparación pueden incluir desnaturalización, alquilación, dilución y digestión.

[0154] Como se usa en la presente, la expresión «agente de alquilación en proteínas» o «agente de alquilación» se refiere a un agente usado para alquilar determinados residuos de aminoácidos libres en una proteína. Ejemplos no taxativos de agentes de alquilación en proteínas son yodoacetamida (IOA/IAA), cloroacetamida (CAA), acrilamida (AA), N-etilmaleimida (NEM), metanotiosulfonato de metilo (MMTS) y 4-vinilpiridina o combinaciones de estos.

[0155] Como se usa en la presente, «desnaturalización de proteínas» o «desnaturalización» puede referirse a un proceso en el que la forma tridimensional de una molécula cambia desde su estado natural. La desnaturalización de proteínas se puede llevar a cabo utilizando un agente desnaturizante de proteínas. Los ejemplos no taxativos de un agente desnaturizante de proteínas incluyen calor, pH alto o bajo, agentes reductores como DTT o exposición a agentes caotrópicos. Se pueden utilizar varios agentes caotrópicos como agentes desnaturizantes de proteínas. Los solutos caotrópicos aumentan la entropía del sistema al interferir con las interacciones intramoleculares mediadas por fuerzas no covalentes como los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y los efectos hidrofóbicos. Los ejemplos no taxativos de agentes caotrópicos incluyen butanol, etanol, cloruro de guanidinio, perclorato de litio, acetato de litio, cloruro de magnesio, fenol, propanol, dodecilsulfato de sodio, tiourea, N-lauroilsarcosina, urea y sus sales.

[0156] Como se usa en la presente, el término «digestión» se refiere a la hidrólisis de uno o más enlaces peptídicos de una proteína. Existen varios enfoques para llevar a cabo la digestión de una proteína en una muestra mediante el uso de un agente hidrolizante apropiado, por ejemplo, digestión enzimática o digestión no enzimática. La digestión de una proteína en péptidos constituyentes puede producir una «digestión de péptidos» que puede analizarse más detalladamente mediante análisis de mapeo de péptidos.

[0157] Como se usa en la presente, la expresión «enzima digestiva» se refiere a cualquiera de una gran cantidad de agentes diferentes que puedan realizar la digestión de una proteína. Ejemplos no taxativos de agentes hidrolizantes que pueden llevar a cabo la digestión enzimática incluyen proteasa de *Aspergillus Saitoi*, elastasa, subtilisina, proteasa XIII, pepsina, tripsina, Tryp-N, quimotripsina, aspergillopepsina I, proteasa LysN (Lys-N), endoproteinasa LysC (Lys-C), endoproteinasa Asp-N (Asp-N), endoproteinasa Arg-C (Arg-C), endoproteinasa Glu-C (Glu-C) o proteína T de membrana exterior (OmpT), enzima degradante de inmunoglobulina de *Streptococcus pyogenes* (IdeS), termolisina, papaína, pronasa, proteasa V8 o fragmentos biológicamente activos u homólogos de estos o combinaciones de estos. Para una revisión reciente que describe las técnicas disponibles para la digestión de proteínas, consulte Switazar et ál., “Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments” (Linda Switazar, Martin Giera & Wilfried M. A. Niessen, 12 JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH 1067–1077 (2013)).

[0158] Los métodos convencionales utilizan una enzima digestiva en condiciones y concentraciones suficientes para digerir completamente todas las proteínas de una muestra antes del análisis LC-MS. Sorprendentemente, la presente divulgación encuentra que la identificación y cuantificación de proteínas de baja abundancia, como las HCP, se pueden mejorar mediante una digestión limitada, lo que significa que las enzimas digestivas se usan en condiciones tales que las proteínas de una muestra no se digieren completamente. En algunas modalidades ilustrativas, las proteínas se someten a digestión sin desnaturalización previa, lo que significa que la «digestión natural» se realiza en proteínas plegadas de forma natural. En algunas modalidades ilustrativas, se selecciona una proporción de enzima digestiva a sustrato para garantizar una digestión limitada. En algunas modalidades ilustrativas, una proporción de enzima digestiva a sustrato es menos de aproximadamente 1:100, menos de aproximadamente 1:200, menos de aproximadamente 1:300, menos de aproximadamente 1:400, menos de aproximadamente 1:500, menos de aproximadamente 1:600, menos de aproximadamente 1:700, menos de aproximadamente 1:800, menos de aproximadamente 1:900, menos de aproximadamente 1:1000, menos de aproximadamente 1:2000, menos de aproximadamente 1:3000, menos de

aproximadamente 1:4000, menos de aproximadamente 1:5000, menos de aproximadamente 1:6000, menos de aproximadamente 1:7000, menos de aproximadamente 1:8000, menos de aproximadamente 1:9000, menos de aproximadamente 1:10000, aproximadamente 1:400, aproximadamente 1:1000, aproximadamente 1:2500 o aproximadamente 1:10000.

[0159] Como se usa en la presente, la expresión «agente reductor de proteína» se refiere al agente usado para la reducción de puentes disulfuro en una proteína. Ejemplos no taxativos de agentes reductores de proteína usados para reducir una proteína son ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol, reactivo de Ellman, clorhidrato de hidroxilamina, cianoborohidruro de sodio, clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP-HCl) o combinaciones de estos.

[0160] Tal como se usa en la presente, la expresión «cromatografía líquida» se refiere a un proceso en el que una mezcla biológica y/o química transportada por un líquido puede separarse en componentes como resultado de la distribución diferencial de los componentes a medida que fluyen a través (o hacia el interior) de una fase sólida o líquida estacionaria. Los ejemplos no taxativos de cromatografía líquida incluyen cromatografía líquida de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de interacción hidrofílica o cromatografía de modo mixto. En algunos aspectos, la muestra o eluido puede someterse a cualquiera de los métodos cromatográficos mencionados anteriormente o una combinación de estos.

[0161] Tal como se usa en la presente, la expresión «espectrómetro de masas» incluye un dispositivo capaz de identificar especies moleculares específicas y medir sus masas con precisión. El término pretende incluir cualquier detector molecular en el que se pueda caracterizar un polipéptido o péptido. 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 de analitos pueden transferirse a la fase gaseosa y ionizarse simultáneamente (como en la ionización por electronebulización) o a través de procesos separados. La elección de la fuente de iones depende de la aplicación.

[0162] El espectrómetro de masas se puede acoplar a un sistema de

seguimiento de reacciones múltiples por cromatografía líquida. De manera más general, un espectrómetro de masas puede ser capaz de realizar análisis mediante monitoreo de reacciones seleccionadas (SRM), incluida monitoreo de reacciones consecutivas (CRM) y monitoreo de reacciones paralelas (PRM).

- 5 [0163] Como se utiliza en la presente, «monitoreo de reacciones múltiples» o «MRM» se refiere a una técnica basada en espectrometría de masas que puede cuantificar con precisión moléculas pequeñas, péptidos y proteínas dentro de matrices complejas con alta sensibilidad, especificidad y un amplio rango dinámico (Paola Picotti & Ruedi Aebersold, Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions, 9 NATURE METHODS 555–566 (2012)). La MRM se puede realizar normalmente con espectrómetros de masas de triple cuadrupolo en los que se selecciona un ion precursor correspondiente a las pequeñas moléculas/péptidos seleccionados en el primer cuadrupolo y se selecciona un ion fragmento del ion precursor para el seguimiento en el tercer cuadrupolo (Yong Seok Choi et ál., Targeted human cerebrospinal fluid proteomics for the validation of multiple
10 Alzheimer's disease biomarker candidates, 930 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 129–135 (2013)).

- [0164] SRM/MRM/monitoreo de iones seleccionados (SIM) es un método utilizado en espectrometría de masas en tándem en el que se selecciona un ion de una masa particular en la primera etapa de un espectrómetro de masas en tándem y se selecciona un producto iónico de una reacción de fragmentación del ion precursor en la segunda etapa del espectrómetro de masas para su detección. Ejemplos de espectrómetros de masas de triple cuadrupolo (TQMS) que pueden realizar MRM/SRM/SIM incluyen, entre otros, el sistema QTRAP® 6500 (Sciex), el sistema QTRAP® 5500 (Sciex), el sistema Triple QTriple Quad 6500 (Sciex), los sistemas
25 LC/MS de triple cuadrupolo de serie Agilent 6400 y el sistema de triple cuadrupolo Thermo Scientific™ TSQ™.

- [0165] Además de MRM, la elección de péptidos también se puede cuantificar mediante monitoreo de reacciones paralelas (PRM). PRM es la aplicación de SRM con detección paralela de todas las transiciones en un único análisis utilizando un
30 espectrómetro de masas de alta resolución. PRM proporciona alta selectividad, alta sensibilidad y alto rendimiento para cuantificar el péptido seleccionado (Q1) y, por lo

tanto, cuantificar proteínas. Se pueden seleccionar múltiples péptidos específicamente para cada proteína. La metodología PRM puede utilizar el cuadrupolo de un espectrómetro de masas para aislar un ion precursor objetivo, fragmentar el ion precursor objetivo en la celda de colisión y luego detectar los iones producto resultantes en el analizador de masas Orbitrap. PRM puede utilizar un espectrómetro de masas cuadrupolo de tiempo de vuelo (QTOF) o híbrido cuadrupolo-orbitrap (QOrbitrap) para llevar a cabo la identificación de péptidos y/o proteínas. Ejemplos de QTOF incluyen, entre otros, el sistema TripleTOF® 6600 (Sciex), el sistema TripleTOF® 5600 (Sciex), el sistema QTOF X500R (Sciex), el tiempo de vuelo cuadrupolo de masa precisa (Q-TOF) de la serie 6500 (Agilent) y Xevo G2-XS QT de espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo (Waters). Los ejemplos de QOrbitrap incluyen, entre otros, el espectrómetro de masas Orbitrap-cuadrupolo híbrido Q Exactive™ (Thermo Scientific) y Orbitrap Fusion™ Tribrid™ (Thermo Scientific).

[0166] Las ventajas no taxativas de PRM incluyen: eliminación de la mayoría de las interferencias; proporciona más precisión y límites de detección y cuantificación a nivel de atómicos; permite la confirmación segura de la identidad del péptido con la coincidencia de bibliotecas espectrales; reduce el tiempo de desarrollo del ensayo ya que no es necesario preseleccionar transiciones objetivo; y garantiza velocidades de adquisición de datos compatibles con UHPLC con multiplexación de espectro y procesamiento de señales avanzado.

[0167] El espectrómetro de masas en los métodos o sistemas de la presente solicitud puede ser, por ejemplo, un espectrómetro de masas de ionización por electropulverización, un espectrómetro de masas de ionización por nanoelectropulverización o un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, donde el espectrómetro de masas puede acoplarse a un sistema de cromatografía líquida, donde el espectrómetro de masas es capaz de realizar análisis LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas) o LC-PRM-MS (cromatografía líquida-monitoreo de reacciones paralelas-espectrometría de masas). En algunas modalidades ilustrativas, la identificación de péptidos se realiza utilizando PRM-MS.

[0168] En algunas modalidades ilustrativas, el espectrómetro de masas puede ser un espectrómetro de masas en tándem. Tal como se usa en la presente, la

expresión «espectrometría de masas en tándem» incluye una técnica donde se obtiene información estructural sobre las moléculas de muestra mediante el uso de múltiples etapas de selección de masas y separación de masas. Un requisito previo es que las moléculas de muestra se puedan transformar en una fase gaseosa y ionizarse para que se formen fragmentos de manera predecible y controlable después de la primera etapa de selección de masas. MS/MS, o MS², se puede realizar seleccionando y aislando primero un ion precursor (MS¹) y fragmentándolo para obtener información significativa. La MS en tándem se ha realizado con éxito con una amplia variedad de combinaciones de analizadores. Qué analizadores combinar para una determinada aplicación puede estar determinado por muchos factores diferentes, tales 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 en tándem en el espacio y en tándem en el tiempo, pero también hay híbridos en los que 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 que no atrapan. Pueden diseñarse funciones de separación de m/z específicas de modo que en una sección del instrumento se seleccionen iones, se disocien en una región intermedia y los iones producto se transmitan luego a otro analizador para separación m/z y adquisición de datos. En el espectrómetro de masas en tándem en el tiempo, los iones producidos en la fuente de iones pueden atraparse, aislarse, fragmentarse y separarse por m/z en el mismo dispositivo físico.

[0169] Los péptidos identificados por el espectrómetro de masas pueden usarse como representantes sustitutos de la proteína intacta y sus modificaciones postraduccionales. Se pueden utilizar para la caracterización de proteínas al correlacionar datos de MS/MS experimentales y teóricos, estos último generados a partir de posibles péptidos en una base de datos de secuencias de proteínas. La caracterización incluye, de modo no taxativo, secuenciar aminoácidos de los fragmentos de proteínas, determinar la secuenciación de proteínas, determinar la secuenciación de novo de proteínas, localizar modificaciones postraduccionales o identificar modificaciones postraduccionales, análisis de comparabilidad o

combinaciones de estos.

[0170] En algunos aspectos ilustrativos, el espectrómetro de masas puede funcionar con nanoelectropulverización o nanopulverización. El término «nanoelectropulverización» o «nanopulverización», tal como se usa en la presente, se refiere a la ionización por electropulverización a una velocidad de flujo de solvente muy baja, comúnmente cientos de nanolitros por minuto de solución de muestra o menos, a menudo sin el uso de un suministro de solvente externo. La configuración de infusión de electropulverización que forma un nanoelectropulverización puede utilizar un emisor de nanoelectropulverización estático o un emisor de nanoelectropulverización dinámico. Un emisor de nanoelectropulverización estático realiza un análisis continuo de volúmenes bajos de solución de muestra (analito) durante un período de tiempo prolongado. Un emisor de nanoelectropulverización dinámico utiliza una columna capilar y un sistema de suministro de solvente para realizar separaciones cromatográficas en las mezclas antes del análisis mediante el espectrómetro de masas.

[0171] Tal como se utiliza en la presente, la expresión «base de datos» se refiere a una colección compilada de secuencias de proteínas que posiblemente puedan existir en una muestra, por ejemplo, en forma de un archivo en formato FASTA. Las secuencias de proteínas relevantes pueden derivarse de secuencias de ADNc de una especie que se está estudiando. Las bases de datos públicas que pueden usarse para buscar secuencias de proteínas relevantes incluyen bases de datos alojadas, por ejemplo, en Uniprot o Swiss-prot. Se pueden realizar búsquedas en las bases de datos utilizando lo que en la presente se denominan «herramientas bioinformáticas». Las herramientas bioinformáticas brindan la capacidad de buscar espectros de MS/MS no interpretados contra todas las secuencias posibles en las bases de datos y proporcionar espectros de MS/MS interpretados (anotados) como resultado. Ejemplos no taxativos de dichas herramientas son Mascot (www.matrixscience.com), Spectrum Mill (www.chem.agilent.com), PLGS (www.waters.com), PEAKS (www.bioinformaticssolutions.com), ProteinPilot (download.appliedbiosystems.com/proteinpilot), Phenyx (www.phenyx-ms.com), Sorcerer (www.sagenresearch.com), OMSSA (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/), X!Tandem (www.thegpm.org/TANDEM/),

Protein Prospector (prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm), Byonic (www.proteinmetrics.com/products/byonic) o Sequest (fields.scripps.edu/sequest).

[0172] Se entiende que la presente invención no se limita a ninguna de la(s) proteína(s), proteína(s) terapéutica(s), anticuerpo(s), proteína(s) recombinante(s), proteína(s) de la célula hospedadora, proteína(s) variante(s) de secuencia, producto(s) farmacéutico(s) proteico(s), muestra(s), soporte(s) sólido(s), agente(s) alquilante(s) de proteína(s), agente(s) desnaturalizante(s) de proteína(s), agente(s) reductor(es) de proteína(s), enzima(s) digestiva(s), método(s) cromatográfico(s), espectrómetro(s) de masas, base(s) de datos, herramienta(s) bioinformática(s), rango(s) o valor(es) de pH, temperatura(s) o concentración(es) y cualesquiera proteína(s), proteína(s) terapéutica(s), anticuerpo(s), proteína(s) recombinante(s), proteína(s) de la célula hospedadora, proteína(s) variante(s) de secuencia, producto(s) farmacéutico(s) proteico(s), muestra(s), soporte(s) sólido(s), agente(s) alquilante(s) de proteína(s), agente(s) desnaturalizante(s) de proteína(s), agente(s) reductor(es) de proteína(s), enzima(s) digestiva(s), método(s) cromatográfico(s), espectrómetro(s) de masas, base(s) de datos, herramienta(s) bioinformática(s), pH, temperatura(s) o concentración(es) mencionados anteriormente se pueden seleccionar mediante cualquier medio adecuado.

[0173] La presente invención se comprenderá con mayor profundidad en relación con los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos no deben interpretarse como taxativos del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Materiales y métodos para los ejemplos 1-3

Materiales

[0174] El kit de enriquecimiento de proteínas ProteoMiner™ se adquirió de Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA). La tecnología ProteoMiner™ es una herramienta de preparación de muestras para la compresión del rango dinámico de concentración de proteínas en muestras biológicas. Se inmovilizó una gran biblioteca de ligandos hexapéptidos combinatorios en perlas para capturar diversas proteínas. La columna de centrifugación ProteoMiner™ contenía 500 µl de suspensión de perlas (perlas al 4 %, EtOH acuoso v/v al 20 %) con 20 µl de volumen de perlas sedimentadas. El amortiguador de lavado del kit contiene 50 ml de PBS (solución

salina amortiguada con fosfato, NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,4). El amortiguador de elución del kit contiene urea liofilizada CHAPS (urea 8 M, CHAPS al 2 %; el detergente CHAPS es 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propanosulfonato). El amortiguador de rehidratación del kit contiene ácido acético al 5 %.

[0175] Los disolventes de cromatografía de grado LC-MS se adquirieron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Los anticuerpos monoclonales fueron producidos por Regeneron (Tarrytown, NY). El desoxicolato de sodio (SDC), el lauroil sarcosinato de sodio (SLS) y la cloroacetamida (CAA) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se adquirió de Thermo Fisher Scientific. RM 8670 (NISTmAb, estándar de anticuerpo monoclonal NIST, expresado en una línea celular murina) se obtuvo del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, Gaithersburg, MD).

Enriquecimientos de proteínas con el kit de enriquecimiento de proteínas

ProteoMiner™

[0176] Se utilizó el kit de enriquecimiento de proteínas ProteoMiner™ para enriquecer las proteínas de las muestras. Se utilizó un cartucho ProteoMiner™ a pequeña escala para cinco experimentos. Las perlas ProteoMiner™ se lavaron dos veces con 200 µl de amortiguador de lavado proporcionado en el kit. Las perlas se resuspendieron con 200 µL de agua y se transfirieron 40 µL de suspensión de perlas a un tubo para realizar un experimento. mAB DS o NISTmAb se diluyó con agua y luego se ajustó el pH de la solución a pH 6 usando acetato de sodio 25 mM, pH 4,0. La muestra se añadió a la suspensión de perlas ProteoMiner™ para su incubación a temperatura ambiente con rotación durante dos horas. Luego se cargó la mezcla de muestra en una punta con frita. El sobrenadante se eliminó centrifugando a 1000 xg durante 1 minuto. Posteriormente, las perlas se lavaron añadiendo 100 µl de amortiguador de lavado en la punta, seguido de centrifugación a 200 xg durante un minuto tres veces. Finalmente, las proteínas enriquecidas se eluyeron utilizando 10 µl de amortiguador PTS (SDC 12 mM, SLS 12 mM, TCEP 10 mM y CAA 30 mM) seguido de centrifugación a 200 xg durante un minuto tres veces.

[0177] Para un método de digestión limitada ProteoMiner optimizado de la presente invención, se redujo el eluido recogido que contenía las proteínas

enriquecidas. Las proteínas reducidas se digirieron en una proporción de enzima a sustrato de 1:400, a 28°C durante la noche para obtener una solución que contenía una mezcla de péptidos. Luego, la mezcla de péptidos se sometió a reducción, desnaturalización y alquilación.

- 5 [0178] La solución que contenía la mezcla de péptidos se acidificó usando 10 µl de TFA al 10 % para precipitar SDC y SLS. Posteriormente, la solución que contenía la mezcla de péptidos se centrifugó a 14.000 rcf durante veinte minutos. Luego, se desalinó el sobrenadante que contenía la mezcla de péptidos usando la punta de desalinización GL-Tip GC y se secó usando SpeedVac.

10 **Análisis LC-MS/MS**

- [0179] La mezcla de péptidos desalinizados obtenida del enriquecimiento por digestión limitada ProteoMiner™ se secó y se resuspendió en 30 µl de solución de ácido fórmico (FA) al 0,1 %. Se inyectaron cinco µl de la solución que contenía la mezcla de péptidos en un sistema de cromatografía líquida de bajo flujo, por ejemplo,
- 15 el sistema RSLC nano UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Q-Exactive HFX (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos se separaron en una columna C18 de 25 cm (diámetro interior 0,075 mm, 2,0 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific). El amortiguador de la fase móvil contenía FA al 0,1% en agua ultrapura (Amortiguador A) y el amortiguador de elución contenía FA al 0,1% en
- 20 acetonitrilo (ACN) al 80% (Amortiguador B). Los péptidos se eluyeron utilizando un gradiente lineal de 100 minutos a partir del Amortiguador B al 2-25 % a una velocidad de flujo de 300 nl/minuto. El espectrómetro de masas se operó en modo dependiente de los datos. Los diez iones más intensos se sometieron a fragmentación de disociación por colisión de mayor energía (HCD) con la energía de colisión
- 25 normalizada (NCE) al 27% para cada escaneo MS completo con una resolución de 120.000 (objetivo de control automático de ganancia (AGC) 3e6, tiempo máximo de inyección de 60 ms, m/z 375-1500) y eventos MS/MS con una resolución de 30.000 (objetivo AGC 1e5, tiempo máximo de inyección de 60 ms, m/z 200-2000). Los datos proteómicos de MS se depositaron en el Consorcio ProteomeXchange con el número
- 30 de registro del proyecto PXD016194 a través del repositorio JPOST.

Ejemplo 1. Comparación de métodos de digestión

- [0180] El método ProteoMiner™ descrito previamente para la identificación de

HCP (Chen *et ál.*) (el «método de digestión directa») se comparó con varias técnicas alternativas para optimizar la detección de proteínas de la célula hospedadora (HCP) y otras proteínas de baja abundancia en una muestra que comprende al menos al menos una proteína o péptido de alta abundancia. El método de digestión directa incluye las etapas de poner en contacto una muestra que comprende al menos una proteína o péptido de alta abundancia con un soporte sólido, como perlas, donde los ligandos peptídicos que interactúan se han unido al soporte sólido y las impurezas de HCP pueden unirse a los ligandos peptídicos que interactúan, por ejemplo, perlas ProteoMiner™; lavar el soporte sólido usando una solución que comprende un tensioactivo para enriquecer las impurezas de HCP y proporcionar un eluido; someter el eluido a desnaturalización, alquilación y reducción; someter el eluido desnaturalizado, alquilado y reducido a una reacción de digestión enzimática para generar componentes de las impurezas de HCP enriquecidas; identificar los componentes de las impurezas de HCP enriquecidas utilizando un espectrómetro de masas; y utilizar los componentes identificados para identificar las impurezas de HCP enriquecidas.

[0181] Un enfoque alternativo es un método de digestión natural en perlas, donde las impurezas de HCP se someten a digestión enzimática antes de la elución del soporte sólido. Otro enfoque alternativo es la «digestión desnaturalizada suave por elución» o «digestión limitada», donde se eluyen las impurezas de HCP; se someten a digestión limitada, utilizando una proporción más baja de enzima digestiva a sustrato; se someten a reducción, desnaturalización y alquilación; y luego se analizó usando un espectrómetro de masas. En la FIG. 1 se muestra un ejemplo de grupo de trabajo del método de digestión limitada.

[0182] Estas tres técnicas alternativas se compararon en función de su capacidad para identificar HCP en una muestra de sustancia farmacológica de anticuerpo monoclonal (mAb DS) y para identificar proteínas UPS2 enriquecidas en una muestra de mAb DS. UPS2 es un estándar proteómico disponible comercialmente que comprende 48 proteínas humanas en un amplio rango dinámico de concentraciones que abarca muchos órdenes de magnitud. La digestión limitada de ProteoMiner™ fue el enfoque más sensible, como se muestra en la Tabla 1 y la FIG. 2.

Tabla 1.1 Comparación de métodos de digestión

ProteoMiner + Método de digestión	Cantidad de proteínas de la célula hospedadora	2,14- 16,58 ppm	0,16- 1,5 ppm	0,02- 0,14 ppm	Cantidad de UPS2 0,02-0,14 ppm
Digestión directa	90	8/8	8/8	5/8	5
Digestión natural en perlas	40	8/8	6/8	1/8	1
Digestión de elución limitada	139	8/8	7/8	8/8	8

Ejemplo 2. Optimización de parámetros

[0183] En función de la efectividad del método ProteoMiner™ de digestión limitada para la identificación de proteínas de baja abundancia como se muestra en el

5 Ejemplo 1, este método se optimizó aun más. El método se realizó con proporciones decrecientes de enzima tripsina:sustrato para la digestión, y se comparó la sensibilidad de la identificación de las proteínas HCP y UPS2. El método descrito anteriormente utilizó una proporción de 1:20 enzima:sustrato. Se encontró que una

10 proporción de 1:400 enzima:sustrato era la más efectiva, como se muestra en la Tabla 2 y la FIG. 3.

Tabla 2.2 Comparación de proporciones de enzima digestiva:sustrato

Relación mAb:tripsina	Cantidad de proteínas de la célula hospedadora	1,07- 8,29 ppm	0,08- 0,75 ppm	0,01- 0,07 ppm	Cantidad de UPS2 0,01- 0,07 ppm
1:20	78	8/8	8/8	3/8	3
1:400	118	8/8	7/8	5/8	5
1:1000	91	8/8	7/8	5/8	5
1:2500	92	8/8	7/8	4/8	4
1:10000	44	8/8	7/8	0/8	0

[0184] Sin intención de limitarse a ninguna teoría, se cree que una digestión más limitada puede conducir a una disminución desproporcionada en la digestión de la proteína o proteínas de alta abundancia en la muestra, reduciendo aun más el rango

dinámico de los péptidos digeridos y permitiendo una medición más efectiva de proteínas de baja abundancia. Someter una muestra de proteína a digestión natural, sin desnaturalización, contribuye a una digestión más limitada, al igual que someter una muestra de proteína a una proporción más baja de enzima digestiva a sustrato (Huang *et ál.*).

[0185] El método de la presente invención se optimizó aun más comparando un rango de concentraciones de reactivos de desnaturalización. Se encontró que una concentración de SLS/SDC de 12 mM era la más efectiva para la identificación de proteínas HCP y UPS2, como se muestra en la Tabla 3 y la FIG. 4.

10 Tabla 3.3 Comparación de concentraciones de agentes desnaturalizantes

Concentración de SLS/SDC	Cantidad de proteínas de la célula hospedadora	1,07-8,29 ppm	0,08-0,75 ppm	0,01-0,07 ppm	Cantidad de UPS2 0,01-0,07 ppm
12 mM	115	8/8	7/8	6/8	6
4 mM	104	8/8	7/8	5/8	5
2,4 mM	91	8/8	7/8	5/8	5

[0186] Estas condiciones optimizadas se utilizaron para experimentos adicionales.

Ejemplo 3. Estudios de casos con un método ProteoMiner™ optimizado

[0187] Se utilizó el método optimizado descrito en el Ejemplo 2 con UPS2 añadido a una muestra de mAb DS, en comparación con el método ProteoMiner™ descrito anteriormente. El método optimizado de la presente invención tuvo una efectividad superior en la identificación de proteínas UPS2 de baja abundancia en comparación con el método descrito anteriormente, como se muestra en la FIG. 5. La columna UPS2 a la derecha en las Tablas 1 a 3 representa el estándar UPS2 digerido directamente sin agregar mAb DS, como control para el límite de detección del instrumento.

[0188] Ambos métodos identificaron todas las proteínas añadidas en el nivel de 1 a 4 ppm. En el nivel de 0,1 a 1 ppm, el método ProteoMiner™ descrito anteriormente identificó 8/8 proteínas añadidas, mientras que el método de digestión limitada ProteoMiner™ optimizado identificó 7/8. En el nivel de 0,01 a 0,07 ppm, el método

ProteoMiner™ descrito anteriormente identificó 3/8 proteínas añadidas, mientras que el método de digestión limitada ProteoMiner™ optimizado identificó 8/8. En el nivel de 0,001 a 0,006 ppm, el método ProteoMiner™ descrito anteriormente identificó 0/8 proteínas añadidas, mientras que el método de digestión limitada ProteoMiner™ optimizado identificó 3/8.

[0189] El método optimizado de la presente invención se comparó además con los métodos convencionales que utilizan mAb DS como muestra, con y sin UPS2 añadido. Los métodos convencionales comparados incluyen inmunoprecipitación, filtración, digestión limitada sola y el método ProteoMiner™ descrito anteriormente. En mAb DS sin UPS2 añadido, el método optimizado de la presente invención fue más efectivo para identificar HCP que cualquier otro método, como se muestra en la FIG. 6. En mAb DS con UPS2 añadido, el método optimizado de la presente invención fue más efectivo para identificar proteínas UPS2 que cualquier otro método, como se muestra en la FIG. 7. En la FIG. 7, la primera columna representa el número total de proteínas UPS2 identificadas y la segunda columna representa el número de proteínas UPS2 identificadas en 0,1875 ppm, de un total de ocho. El método optimizado de la presente invención identificó 8/8 proteínas UPS2 a esta concentración.

[0190] El método optimizado de la presente invención se comparó además con los métodos descritos anteriormente utilizando el estándar NIST mAb como muestra. Los métodos convencionales comparados incluyen digestión normal, digestión natural, digestión natural con perlas ProA y espectrometría de movilidad iónica asimétrica de campo (FAIMS), filtración y el método ProteoMiner™ descrito anteriormente. La cantidad de HCP identificadas en una muestra de mAb del NIST utilizando el método de la presente invención se comparó con la cantidad de HCP identificadas utilizando métodos convencionales de acuerdo con publicaciones anteriores. El método de la presente invención fue más eficaz para identificar HCP en la muestra de mAb NIST que cualquier método publicado anteriormente, como se muestra en la FIG. 8.

Materiales y métodos para los Ejemplos 4-6

Materiales

[0191] Los disolventes de cromatografía de grado LC-MS y se adquirieron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Los mAb y las proteínas CHO agregadas

fueron producidas por Regeneron (Tarrytown, NY). El desoxicolato de sodio (SDC), lauroil sarcosinato de sodio (SLS), yodoacetamida, urea, solución salina amortiguada con Tris 10 ×, acetato de amonio, ácido oleico y ácido oleico-¹³C₁₈ (número CAS 287100-82-7) se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La PS80 súper refinada se compró en Croda (East Yorkshire, Reino Unido). El ditioneitol se adquirió de Thermo Fisher Scientific. La palmitoil-proteína tioesterasa 1 humana (hPPT1) y la LPL humana se adquirieron de Abcam. Regeneron Pharmaceuticals sintetizó internamente CHO LAL, CHO componente 1r del complemento (C1r-A), CHO ceramidasa ácida (ASAHI), CHO beta-2-microglobulina, CHO carboxipeptidasa, CHO catepsina D y CHO catepsina Z.

Preparación de estándar interno y curva estándar

[0192] Se disolvieron ocho proteínas recombinantes (LAL, LPL, C1r-A, ASAHI, beta-2-microglobulina, carboxipeptidasa, catepsina D y catepsina Z) en agua hasta una concentración final de 100 ng/μl como soluciones madre. Las soluciones madre se diluyeron aun más a 1 ng/μL y 10 ng/μL, y se agregaron a una matriz de anticuerpos (mAb-1) para la preparación de curvas estándar con las siguientes concentraciones: 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm y 5 ppm. Las proteínas QC se prepararon a partir de una solución madre separada de mezcla de proteínas recombinantes (7 ng/μL de catepsina Z, 17 ng/μL de catepsina D, 35 ng/μL de LAL, 87 ng/μL de carboxipeptidasa y 175 ng/μL de LPL) y se agregaron a mAb-1 para obtener 0,2 ppm de catepsina Z, 0,5 ppm de catepsina D, 1 ppm de LAL, 2,5 ppm de carboxipeptidasa y 5 ppm de LPL. La supuesta fosfolipasa tipo B 2 (hPLBD2) marcada con isótopos pesados se diluyó a 5 ng/μl y se añadió a cada muestra a 5 ppm.

[0193] Se prepararon soluciones madre de dos proteínas recombinantes (LAL y hPPT1) a 1 ng/μL y 5 ng/μL y se agregaron a la matriz de anticuerpos (mAb-2) para la preparación de una curva estándar con las siguientes concentraciones: 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 5 ppm, 10 ppm y 20 ppm. Se diluyó hPLBD2 marcado con isótopos pesados a 5 ng/μl y se añadió a cada muestra a 5 ppm. Se usó la misma matriz de anticuerpos para medir PPT-1 y LAL en mAb-18 y mAb-19.

Preparación de muestras con el método PMLD

[0194] Las proteínas de la célula hospedadora se enriquecieron primero mediante enriquecimiento con ProteoMiner junto con digestión limitada (PMLD). Las

perlas de ProteoMiner se lavaron secuencialmente con amortiguador de lavado y agua y luego se suspendieron en agua. Se diluyó o concentró un total de 15 mg de mAb a 50 mg/ml en agua, se ajustó a pH 6 y se añadió a la suspensión de perlas de ProteoMiner. Cada muestra se incubó con rotación a temperatura ambiente durante 5 2,5 horas y luego se cargó en una punta fabricada internamente con una frita de tamaño de poro de 9,5 mm. Luego se lavaron las perlas y las proteínas enriquecidas se eluyeron tres veces mediante la adición de 10 µl de amortiguador de elución (SDC 12 mM y SLS 12 mM). El eluido recogido luego se preparó adicionalmente mediante una digestión limitada modificada mediante la adición de 75 ng de tripsina, luego se 10 digirió a 28°C durante la noche. Las muestras digeridas se redujeron a 90°C durante 20 min y se alquilaron a temperatura ambiente durante 20 min más. La mezcla de péptidos se acidificó a pH 2–3 con TFA al 10% para precipitar mAb, SDC y SLS en solución ácida. Luego, la mezcla se centrifugó a 14.000 rcf durante 10 min. El sobrenadante que contenía el péptido se recogió y se desalinizó con puntas de 15 desalinización de GC GL-Tip, se secó y se resuspendió en FA al 0,1 % para el análisis nano-LC-MS/MS.

NanoLC-MS/MS no dirigida y análisis de monitoreo de reacciones paralelas dirigidas

[0195] La mezcla de péptidos se inyectó en un sistema nano RSLC UltiMate™ 20 3000 acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific). Las mezclas de péptidos se cargaron en una columna trampa Acclaim PepMap 100 C18 de 20 cm × 0,075 mm (Thermo Fisher Scientific) para desalinización y luego se separaron en una columna integrada C18 de 25 cm × 75 µm ID × 1,7 µm (CoAnn Technologies). Los péptidos se separaron con un gradiente lineal de 150 25 minutos del 2% al 32% de disolvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 300 nL/min. Se utilizó un espectrómetro de masas Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific) operado en modo dependiente de datos para la detección de HCP no dirigida. Para la detección de PRM dirigida, cada muestra se analizó bajo PRM con una ventana de aislamiento de 2 m/z. En todos los 30 experimentos, un espectro de masas completo con una resolución de 60.000 en relación con m/z 200 (objetivo de AGC normalizado (%) 300, tiempo máximo de inyección de 20 ms, m/z 380–1600) fue seguido por exploraciones PRM programadas

en el tiempo con una resolución de 15.000 (objetivo de AGC normalizado (%) 100, tiempo máximo de inyección de 60 ms). Se utilizó HCD con NCE al 30%.

Análisis de datos

[0196] Los archivos sin procesar de espectrometría de masas se buscaron en
 5 UniProt Cricetulus Griseus (versión 2020) sin entradas redundantes, con el software
 Byonic (versión 4.1.10). La tolerancia de masa se fijó en 10 ppm y la tolerancia de
 masa de fragmentos se fijó en 20 ppm. Los criterios de búsqueda incluyeron
 carbamidometilación estática de cisteínas (+ 57,0214 Da) y modificación variable de
 oxidación (+15,9949 Da) de residuos de metionina. La búsqueda en la base de datos
 10 se realizó con digestión con tripsina con un máximo de dos escisiones omitidas. Las
 HCP se identificaron positivamente cuando se encontraron al menos dos péptidos
 únicos. Los datos de PRM se seleccionaron manualmente en Skyline (versión 21.1).

Perfil de degradación de PS80 de mAb-3 con 2DLC-CAD

[0197] Se realizó un perfil de degradación de PS80. mAb-3 que contenía PS80
 15 al 0,1% se diluyó al 0,004% en agua y se inyectó en un sistema HPLC-CAD 2D. PS80
 se retuvo en una columna Oasis Max (2,1 × 20 mm, 30 mm), se separó mediante una
 columna Acquity BEH C4 (2,1 × 50 mm, 1,7 mm) y se detectó con un detector Corona
 Ultra CAD.

Hidrólisis acelerada de PS80 en productos farmacéuticos formulados

20 [0198] Se realizó la hidrólisis acelerada de PS80 en mAb-3 a mAb-15. El
 estándar interno ácido oleico-¹³C₁₈ se añadió a los mAb, hasta una concentración final
 de 1 µg/ml, y también se añadió una solución madre de PS80 al 10 % a los mAb, hasta
 una concentración final de 1 % de PS80. Todas las muestras se incubaron a 37°C
 durante 3 o 5 días, y se recogieron 10 µL de cada muestra antes y después de la
 25 incubación para la cuantificación del ácido oleico.

Cuantificación de ácido oleico en mAbs

[0199] El ácido oleico liberado por la degradación de PS80 en la muestra de
 estabilidad de mAb-3 se cuantificó mediante LC-MRM. Se añadieron 90 µl de
 amortiguador de extracción que contenía 1 µg/ml de ácido oleico-¹³C₁₈ en IPA al 80
 30 %/MeOH al 20 % a 10 µl de cada muestra de estabilidad de mAb-3, se mezclaron y
 se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, la proteína se precipitó
 mediante centrifugación a 14.000 rcf a 25°C durante 30 minutos, y se transfirieron 40

5 μL de sobrenadante que contenía ácido oleico a una placa de 96 pocillos para el análisis LC-MRM. El ácido oleico liberado a través de la hidrólisis acelerada de PS80 en mAb-3 a mAb-15 se cuantificó con LC-MRM de manera similar, excepto que el amortiguador de extracción contenía IPA al 80 %/MeOH al 20 % sin el estándar interno
 10 ácido oleico- $^{13}\text{C}_{18}$ añadido a las muestras de mAb-3 a mAb-15 antes y después de la incubación. El ácido oleico y el ácido oleico- $^{13}\text{C}_{18}$ se cuantificaron monitoreando los picos 281,2/281,2 y 299,2/299,2 con un espectrómetro de masas Agilent 6495 QQQ equipado con un Agilent 1290 Infinity UHPLC (Agilent, Wilmington, DE). La integración máxima se realizó en Skyline y la concentración de ácido oleico se calculó sobre la base de una curva de calibración creada a partir de un gráfico de concentración de ácido oleico añadido contra $\frac{\text{área máxima de FFA}}{\text{área máxima de ISTD}}$.

Medición de recorte de MY mediante análisis de masa intacta de DS-1 a DS-3

[0200] El recorte entre los residuos de aminoácidos metionina y tirosina (recorte MY) en DS se identificó y cuantificó mediante análisis de masa intacta. Las muestras
 15 de DS se redujeron mediante una mezcla de 5 μg de DS a 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con 4 μL de amortiguador PNGasa rápida 5x (New England Biolabs) y se incubaron a 80°C durante 10 minutos. La desglucosilación se realizó mediante la adición de 1 μL de PNGasa rápida (New England Biolabs) a la mezcla y la incubación a 50°C durante 25 minutos. Posteriormente, se inyectaron 2 μg de cada muestra en el sistema LCMS, se
 20 separaron mediante cromatografía de fase inversa con una columna de polifenilo BioResolve RP mAb (2,7 μm , 2,1 mm $\times$ 50 mm) y se detectaron con un espectrómetro de masas Waters G2S. Los datos de MS se analizaron en el software MassLynx de Waters.

25 Ejemplo 4. Identificación de HCP a través de perfiles de HCP no específicas de PMLD

[0201] Se utilizó el enriquecimiento de ProteoMiner junto con digestión limitada (PMLD) junto con un análisis PRM dirigido para cuantificar las HCP en un nivel inferior a ppm. Esta cuantificación dirigida basada en enriquecimiento mejoró aun más la
 30 detección hasta tan solo 0,06 ppm, con alta exactitud y precisión, en comparación con otros métodos de cuantificación basados en espectrometría de masas. El límite de detección bajo fue crítico para la evaluación de riesgos: Se descubrió que 0,13 ppm de carboxilesterasa hepática (CES), 2,48 ppm de lipasa ácida lisosomal (LAL), 1,46

ppm de palmitoil-proteína tioesterasa 1 (PPT-1) y 0,5 ppm de catepsina D tenían efectos negativos sobre la estabilidad del producto farmacéutico, mientras que se encontró que 0,5 ppm de lipoproteína lipasa (LPL), 0,04 ppm de CES, 0,8 ppm de LAL, 0,49 ppm de PPT-1 y 0,3 ppm de catepsina D eran seguros al permitir que los productos farmacéuticos mantuvieran una vida útil de 2-3 años.

[0202] La capacidad de degradación del polisorbato (PS) de diferentes enzimas degradantes de PS (PSDE) generalmente se evalúa comparando la actividad en experimentos de adición con proteínas recombinantes. Sin embargo, la actividad lipasa observada de las proteínas recombinantes puede no representar la actividad de las proteínas endógenas. Por ejemplo, la degradación del PS observada en la supuesta fosfolipasa B tipo 2 (PLBD2) puede deberse a impurezas más que al propio PLBD2. Sigue siendo cuestionable si la LPL puede degradar PS, porque ni la CHO LPL recombinante ni la LPL endógena por debajo de 1,5 ppm muestran actividad de lipasa. El enriquecimiento de ProteoMiner junto con la digestión limitada (PMLD) junto con el análisis PRM dirigido proporcionó un método cuantitativo para la comparación de la actividad de la lipasa de PSDE a través de la correlación de la actividad de la lipasa con las concentraciones endógenas de PSDE en DP. La causa principal de la degradación del PS se puede deducir según la correlación entre el PSDE y la actividad de la lipasa.

[0203] Se realizó un perfil de HCP con PMLD para varios mAb internos para determinar la matriz más adecuada para el desarrollo del método PRM. El flujo de trabajo PMLD se muestra en la FIG. 9. El límite de detección de PMLD era tan bajo como 0,002 ppm. Se eligió mAb-1 como matriz para la curva estándar y el control de calidad, porque mostró una interferencia mínima (≤ 10 % del nivel LLOQ) para los ocho estándares de proteína CHO recombinante añadidos, como se muestra en la FIG. 10. Se eligió mAb-2 como matriz para las curvas estándar para PPT-1 y LAL, porque era el mismo mAb que mAb-18 y mAb-19 pero no contenía PPT-1 ni LAL. mAb-3 contenía varios niveles de HCP y, por lo tanto, se utilizó para evaluar la reproducibilidad intraejecución. mAb-4 a mAb-16 eran anticuerpos con diferentes niveles de actividad de lipasa que se usaron para acceder a concentraciones biológicamente relevantes de lipasa o esterasa. La lipasa que provocó la degradación de PS80 en mAb-3 a mAb-10 fue LAL. La esterasa que causó la degradación de PS80

en mAb-11 a mAb-17 fue CES, y las dos lipasas que contribuyeron a la degradación de PS80 en mAb-18 y mAb-19 fueron LAL y PPT-1. DS-1 a DS-3 son proteínas de fusión que se utilizan para evaluar la concentración biológicamente relevante de catepsina D.

5 Ejemplo 5. Desarrollo del método PMLD-PRM para la cuantificación de HCP

[0204] La Tabla 4 muestra el péptido triptico que se seleccionó para cada HCP para la cuantificación de PRM dirigida. Estos péptidos se eligieron porque mostraban una alta intensidad de señal de MS, ninguna o baja modificación postraducciona y ninguna escisión perdida, y eran únicos para cada HCP CHO. hPLBD2 sirvió como estándar interno común para toda la cuantificación de HCP. La relación del área máxima (PAR) de los péptidos HCP seleccionados se obtuvo dividiendo el área máxima del péptido hPLBD2 entre el área máxima del péptido HCP. La PAR se utilizó para construir una curva de calibración para la cuantificación. El grado relativo de enriquecimiento de cada HCP individual con el método PMLD fue comparable al de hPLBD2 en la misma muestra de mAb, porque ProteoMiner es un método de enriquecimiento no sesgado. De hecho, la FIG. 11A muestra la cuantificación basada en PRM de las ocho HCP en mAb-1, que oscilan entre 0,05 y 5 ppm, seguida de una ecuación de regresión lineal con un coeficiente de regresión (R^2) superior a 0,99. Este hallazgo sugirió que el rango dinámico del método de enriquecimiento de PMLD seguido del análisis de PRM dirigido era adecuado para la cuantificación de HCP que oscilaban desde niveles inferiores a ppm hasta niveles bajos de ppm. El análisis PMLD-PRM se realizó en PPT-1 y LAL humanos en un rango de 0,1 a 20 ppm en mAb-2 para probar si el análisis PMLD-PRM podría aplicarse a una gama más amplia de HCP. La FIG. 11B muestra que se observó una línea de regresión lineal tanto para PPT-1 como para LAL humanos, con un coeficiente de regresión (R^2) superior a 0,99. Tabla 4.4 Péptidos HCP identificados con mayor frecuencia en el análisis proteómico de escopeta para cada HCP y hPLBD2

Proteína de la célula hospedadora (HCP)	Péptido para análisis PRM
Lipoproteína lipasa (LPL)	GLGDVDQLVK
Componente 1r del complemento (C1r-A)	SLSNGYLHYITTK
Ceramidasa ácida (ASAH1)	GQFESYLR
Beta-2-microglobulina	GILLDTSR

Carboxipeptidasa	EFSHITFLTIK
Lipasa ácida lisosomal (LAL)	VNVYTSHSPAGTSVQNLR
Catepsina D	VSSLPSVTLK
Catepsina Z	GVNYASITR
Palmitoil-proteína tioesterasa 1 (PPT-1)	ETIPLQESTLYTEDR (CHO) ETIPLQETSLYTQDR (humano)
Fosfolipasa B putativa 2 (hPLBD2)	AFIPNGPSPGSR[+10]

[0205] Se evaluó la reproducibilidad entre series y la precisión de la cuantificación del método PMLD-PRM con una mezcla de cinco estándares de control de calidad enriquecidos con mAb-1 con tres réplicas. La mezcla de cinco péptidos QC se preparó con diferentes concentraciones de cinco HCP: 0,2 ppm de catepsina Z, 0,5 ppm de catepsina D, 1 ppm de LAL, 2,5 ppm de carboxipeptidasa y 5 ppm de LPL. La concentración de cada estándar de control de calidad se eligió en función de su abundancia en mAb-1, para minimizar la interferencia en los escaneos que se muestran en la FIG. 10 y ser biológicamente relevante para la calidad del producto farmacéutico. Como se muestra en la Tabla 5, la precisión de la detección de los péptidos de control de calidad de cinco HCP que oscilan entre 0,2 ppm y 5 ppm estuvo dentro del 85% al 111% de los valores teóricos, con una variación inferior al 12% entre los triplicados. Los resultados de la cuantificación se basan en péptidos de cada HCP enriquecida con mAb-1, y cada muestra enriquecida se analizó por triplicado. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) osciló entre 0,06 ppm y 0,66 ppm.

Tabla 5.5 Precisión de la cuantificación demostrada por un estudio de adición de cinco HCP

Nombre de proteína	Concentración de adición (ppm)	Concentración medida (ppm)	% CV (N=3)	% Precisión	LLOQ calculado (ppm)
catepsina Z	0,2	0,17	11,8 %	15,0%	0,06
catepsina D	0,5	0,55	10,9 %	10,0%	0,14
LAL	1	0,91	5,0%	9,2%	0,14

Carboxipeptidas a	2,5	2,58	8,5%	3,2%	0,66
LPL	5	5,36	4,5%	7,2%	0,43

[0206] La reproducibilidad intraensayo se evaluó con mAb-3, que contenía HCP en varios niveles que oscilaban entre 0,03 ppm y 4,24 ppm. Se prepararon y analizaron tres réplicas biológicas de mAb-3 por separado en tres días diferentes, y se evaluaron cuantitativamente seis HCP, cuyos resultados se muestran en la Tabla 6. La precisión estuvo dentro del 25 % para todas las HCP por debajo de 0,5 ppm y estaba dentro del 20% para las HCP por encima de 0,5 ppm. Los resultados de la cuantificación se basan en péptidos de cada HCP enriquecida con mAb-3, y cada muestra se analizó por triplicado.

Tabla 6.6 Concentraciones medidas de seis HCP de mAb-3

Nombre de proteína	Concentración medida (ppm) Ejecución-1	Concentración medida (ppm) Ejecución-2	Concentración medida (ppm) Ejecución-3	Promedio Concentración medida (ppm)	CV %
C1r-A	0,04	0,03	0,02	0,03	25,4 %
catepsina Z	0,03	0,03	0,03	0,03	0,9%
LPL	0,15	0,21	0,23	0,20	19,8 %
Beta-2-microglobulina	0,30	0,35	0,38	0,34	11,9 %
LAL	1,20	1,54	1,10	1,28	17,8 %
catepsina D	4,56	4,56	3,60	4,24	13,1 %

10 Ejemplo 6. Concentraciones biológicamente relevantes de HCP seleccionadas

[0207] Niveles inferiores a ppm de lipasas o esterasas provocan la degradación del PS en productos farmacéuticos durante el almacenamiento a largo plazo. La Tabla 6 y FIG. 12A muestran que se detectaron 1,28 ppm de LAL en mAb-3 y condujeron a

una degradación del 20 % de PS80, y la FIG. 12B muestra que se liberaron 23 µg/ml de ácido oleico a 4–8 °C en 6 meses. La FIG. 12C muestra que LAL, que oscilaba entre 0,1 ppm en mAb-3 y 3,5 ppm en mAb-10, se cuantificó con precisión usando PMLD. El coeficiente de regresión (R^2) fue superior a 0,98 entre el ácido oleico liberado de la degradación de PS80 y la concentración de LAL medida. Se determinó que la concentración de LAL era 0,1 ppm en mAb-4 mediante el método PMLD. La FIG. 12C muestra que 0,1 ppm de LAL en mAb-4 no causaron ninguna degradación visible de PS80 en 4 días a 37°C. Por lo tanto, el bajo límite de detección de LAL, de 0,1 ppm, ayudó a estimar con precisión los posibles efectos negativos de LAL en la degradación de PS80 y podría usarse para predecir la vida útil potencial de los productos farmacéuticos. Se detectó LPL en concentraciones inferiores a 0,5 ppm en las ocho muestras, desde mAb3 hasta mAb10. La FIG. 12C muestra que la degradación de PS80 no se correlacionó con la concentración de LPL en mAb-3 a mAb-10, con un R^2 de 0,19, lo que sugiere de este modo que LPL no afectó a PS80. La FIG. 12C también demuestra que 0,5 ppm de LAL liberaron 1,45 µg/ml de ácido oleico de la degradación de PS80 por día a 37°C.

[0208] CES es una esterasa que, cuando está presente en baja abundancia, puede degradar PS80. Por ejemplo, 20 ppm de CES provocan el agotamiento completo de los monoésteres de las especies PS80 a una temperatura de 4 a 8°C en 24 horas. Se determinó que la concentración de CES en mAb-11 era 2,3 ppm mediante cuantificación mediante digestión natural acoplada con MRM. En mAb-12, que es el mismo mAb que mAb-11 pero se obtuvo mediante diferentes etapas de purificación, PMLD no detectó CES y no se observó degradación de PS80. mAb-13 se formuló mediante una mezcla de mAb-11 y mAb-12 en una proporción de 1:9; en consecuencia, se determinó que la concentración de CES en mAb-13 era 0,23 ppm. mAb-14 se formuló mediante una mezcla de mAb-11 y mAb-12 en una proporción de 1:49, y se determinó que la concentración de CES en mAb-14 era 0,046 ppm. mAb-12 a mAb-17 se enriquecieron con PMLD, y la abundancia absoluta de CES en cada muestra se calculó como abundancia relativa con respecto a mAb-13 y mAb-14. La FIG. 13 muestra que se estableció una correlación entre el aumento de la concentración de ácido oleico por día y la concentración de CES. Se estimó que incluso 0,1 ppm de CES conducirían a un aumento de ácido oleico de 5,4 µg/ml por

día en condiciones de degradación acelerada (37°C).

[0209] Se descubrió que PPT-1 y LAL eran las posibles causas de la degradación de PS80 tanto en mAb-18 como en mAb-19. A diferencia del mAb-3, en el que sólo LAL, pero no LPL, fue responsable de la degradación de PS80, tanto PPT-1 como LAL desempeñaron funciones clave en la degradación de PS80. La Tabla 4 muestra que la cuantificación de CHO PPT-1 se realizó con el péptido ETIPLQESTLYTEDR, mientras que la curva de calibración se creó con el péptido PPT-1 humano ETIPLQETSLYTQDR, debido a la falta de CHO PPT-1 recombinante. Dada la diferencia de un solo residuo de aminoácido entre los 15 residuos, no se esperaba que la eficiencia de ionización variara sustancialmente entre estos dos péptidos.

[0210] La Tabla 7 muestra los resultados de la cuantificación de PPT-1 y LAL en mAb-18 y mAb-19, así como la medición del ácido oleico liberado después de la incubación a 37°C; Se detectaron 1,8 ppm de PPT-1 y 0,39 ppm de LAL en mAb-18, lo que dio como resultado un aumento de ácido oleico de 8,57 µg/ml por día, respectivamente, mientras que se encontraron 1,1 ppm de PPT-1 y 0,34 ppm de LAL en mAb-19 y dieron como resultado un aumento de ácido oleico de 5,28 µg/mL por día en condiciones de degradación acelerada (37°C). Sobre la base de los resultados de mAb-3 en la FIG. 12, se encontró que 0,5 ppm de LAL degradaban aproximadamente 1,45 µg/ml de ácido oleico por día a 37°C. Se estimó que 1 ppm de PPT-1 indujo un aumento de aproximadamente 4 µg/ml de ácido oleico por día.

Tabla 7.7 Cuantificación del aumento de PPT-1, LAL y ácido oleico por día en mAb-18 y mAb-19

	PPT-1 (ppm)	LAL (ppm)	Aumento de ácido oleico (µg/mL por día @ 37°C)
mAb-18	1,80	0,39	8,57
mAb-19	1,13	0,34	5,28

[0211] La FIG. 14 muestra que se observó una degradación del 71,6% de PS80 después de que se incubara mAb-18 durante 36 meses a 4-8 °C. Las partículas visibles y subvisibles se forman después de una degradación del 61 % del PS80. Aunque la formación de partículas puede variar entre diferentes formulaciones de proteínas, esta observación se utilizó para estimar el tiempo de formación de

partículas. Utilizando los resultados del estudio de estabilidad de mAb-18, se estimó que aproximadamente 7,3 µg/ml de ácido oleico liberado por día en condiciones de degradación acelerada (37°C) darían como resultado una degradación del 61 % del PS80 con la posterior formación de partículas en 36 meses. Por lo tanto, a través de un estudio de estabilidad a largo plazo, se estimó que 1,8 ppm de PPT-1, 0,14 ppm de CES o 2,5 ppm de LAL probablemente provocarían la formación de partículas en el DP. La actividad relativa de la lipasa entre diferentes PSDE también se comparó sobre la base del aumento de ácido oleico por día por ppm de enzima, que se calculó en 2,9, 54,7 y 4,1 µg/ml por día por ppm para LAL, CES y PPT-1. respectivamente. Por lo tanto, la capacidad de degradación de PS de estas tres enzimas se clasificó como CES > PPT-1 > LAL.

[0212] Las lipasas y esterases no son los únicos tipos de HCP de alto riesgo que deben cuantificarse en niveles inferiores a ppm. La FIG. 15 muestra que, durante estudios de estabilidad elevada de las sustancias farmacológicas DS-1, DS-2 y DS-3, la catepsina D causó más del 12 %, 4 % y 0,2 % de recorte, respectivamente, entre los residuos de aminoácidos metionina y tirosina bajo condiciones de estrés de 45°C en 6 meses. Se utilizó el análisis de cuantificación PMLD-PRM para determinar que las concentraciones de catepsina D en DS-1, DS-2 y DS-3 fueron 1,5 ppm, 1,1 ppm y 0,3 ppm de catepsina D, respectivamente. Los resultados indicaron que en concentraciones tan bajas como 1,1 ppm o superiores, la catepsina D escinde las proteínas, mientras que, a 0,3 ppm, muestra una escisión de proteínas insignificante.

Ejemplo 7. Uso de ProteoMiner™ para mejorar el límite de detección de mAb VS NIST

[0213] El método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación mejora el método ProteoMiner™ para la identificación de HCP descrito por Chen *et ál.* para identificar variaciones de secuencia dentro de los mAb VS NIST, como se muestra en la FIG. 17. El método de enriquecimiento de ProteoMiner™ VS incluye las etapas de poner en contacto una muestra que comprende al menos una proteína o péptido más abundante cuya secuencia de aminoácidos no fue alterada involuntariamente (por ejemplo, de tipo silvestre o recombinante) con un soporte sólido, tales como perlas, donde los ligandos peptídicos que interactúan están unidos al soporte sólido y los mAb VS NIST pueden unirse a los

ligandos peptídicos que interactúan, por ejemplo, perlas ProteoMiner™; lavar el soporte sólido usando una solución que comprende un tensioactivo para enriquecer los mAb VS NIST y proporcionar un eluido; someter el eluido a desnaturalización, alquilación y reducción; someter el eluido desnaturalizado, alquilado y reducido a una

5 reacción de digestión enzimática para generar componentes de los mAb VS NIST enriquecidos (por ejemplo, digestión directa); identificar los componentes de los mAb VS NIST enriquecidos utilizando un espectrómetro de masas; y usar los componentes identificados para identificar sustituciones de aminoácidos dentro de los mAb VS NIST enriquecidos.

10 [0214] El método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación, nanoLC, o una combinación de estos, permitió la detección de sustituciones de aminoácidos dentro de los mAb VS NIST que incluían alanina a ácido glutámico, prolina, treonina o valina, cisteína a glicina, serina o tirosina, ácido aspártico a ácido glutámico, ácido glutámico a ácido aspártico o valina, fenilalanina a

15 serina, tirosina o leucina o isoleucina, glicina a ácido aspártico, ácido glutámico o serina, histidina a asparagina, ácido aspártico o tirosina, isoleucina a arginina, lisina a arginina, leucina a arginina, glutamina, fenilalanina o prolina, metionina a treonina, leucina o isoleucina, prolina a alanina, histidina, leucina o serina, arginina a lisina, serina a asparagina, fenilalanina, prolina, treonina, leucina o isoleucina, treonina a

20 alanina, asparagina, isoleucina o serina, valina a alanina, glutamina, metionina, leucina o isoleucina, triptófano a serina y tirosina a ácido aspártico, cisteína o fenilalanina, como se muestra en la FIG. 18A, FIG. 18B y FIG. 18C. Las células resaltadas en rojo muestran las sustituciones de aminoácidos en los péptidos VS que se enriquecieron usando el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de

25 proteínas VS de la presente divulgación, nanoLC o una combinación de estos.

Ejemplo 8. Uso de ProteoMiner™ para enriquecer mAb VS NIST

[0215] La FIG. 19A muestra una tabla de variaciones de secuencia de aminoácidos dentro de mAb VS NIST que se enriquecieron usando el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación,

30 nanoLC o una combinación de estos. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos dentro de los mAb VS NIST enriquecidos generalmente dieron como resultado la sustitución de un aminoácido con un conjunto de características físicas por un

aminoácido con un conjunto diferente de características físicas. Dichas sustituciones afectaron la estructura proteica tridimensional de los mAb VS NIST que se enriquecieron utilizando el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación, nanoLC o una combinación de estos. Las

FIG. 19B, FIG. 19C y FIG. 19D muestran vistas de las variaciones de la secuencia de

aminoácidos del mAb NIST identificadas y enriquecidas usando el método de

identificación ProteoMiner™ VS de la presente divulgación dentro de la estructura

proteica tridimensional de un mAb NIST VS, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0216] Por ejemplo, la FIG. 20A muestra una histidina cargada positivamente

que se sustituyó con un ácido aspártico cargado negativamente o una asparagina

polar sin carga en VS dentro de mAb VS NIST que se enriquecieron usando el método

ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación,

nanoLC, o una combinación de estos. La FIG. 20B muestra posibles secuencias de

codones de histidina, ácido aspártico y asparagina, y que una mutación puntual (por

ejemplo, un ADN mutado) puede dar como resultado la sustitución de un codón de

histidina por un codón de ácido aspártico o asparagina. La FIG. 20C muestra las

variaciones de secuencia de histidina a asparagina o ácido aspártico de mAb de NIST

identificadas usando eluidos de digestiones directas de mAb de NIST sometidos a

columnas CSH LC o nanoLC de flujo regular o digestiones de mAb de NIST

enriquecidos con ProteoMiner™ sometidas a columnas de nanoLC, de acuerdo con

una modalidad ilustrativa. La FIG. 20C también muestra que el método ProteoMiner™

para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación enriqueció

mAb VS NIST con sustituciones de histidina 227, 271 o 313, o una combinación de

estas, para ácido aspártico o asparagina.

[0217] La FIG. 20D muestra el espectro de masas MS2 de iones de producto

de péptido tríptico detectados en un eluido de una digestión directa de mAb de NIST

sometida a una columna de LC CSH de flujo regular (inferior), y el espectro de masas

MS2 de iones de producto de péptido tríptico de histidina a asparagina VS detectados

en un eluido de una digestión de mAb NIST enriquecido con ProteoMiner™ sometido

a una columna nanoLC (superior), de acuerdo con una modalidad ilustrativa. La FIG.

20E muestra el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico

detectados en un eluido de una digestión directa de mAb de NIST sometida a una

columna de LC CSH de flujo regular (inferior), y el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico de histidina a ácido aspártico VS detectados en un eluido de una digestión de mAb NIST enriquecido con ProteoMiner™ sometido a una columna nanoLC (superior), de acuerdo con una modalidad ilustrativa. De manera similar, el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación podría enriquecer los mAb CHO IgG1 con variaciones de secuencia de histidina a asparagina o ácido aspártico. La FIG. 20F muestra que el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación enriqueció mAb IgG1 CHO con sustituciones de histidina 432 o 436, o una combinación de estas, para asparagina. La FIG. 20F también muestra que el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación enriqueció mAb IgG1 CHO con sustituciones de histidina 227, 271, 288, 432 o 436, o una combinación de estas, para ácido aspártico.

Ejemplo 9. ProteoMiner™ enriquece los mAb VS NIST que tienen una estructura proteica tridimensional alterada

[0218] Las variaciones de secuencia de aminoácidos dentro de los mAb VS NIST que no se enriquecieron usando el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación generalmente dieron como resultado la sustitución de un aminoácido con un conjunto de características físicas por un aminoácido con el mismo conjunto de características físicas. Dichas sustituciones no afectaron la estructura proteica tridimensional de los mAb VS NIST que no se enriquecieron utilizando el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación, nanoLC o una combinación de estos.

[0219] Por ejemplo, la FIG. 21A muestra una serina polar no cargada que se sustituyó con una asparagina polar no cargada en VS dentro de mAb VS NIST que no se enriquecieron usando el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación, nanoLC, o una combinación de estos. La FIG. 21B muestra las variaciones de secuencia de serina a asparagina de mAb NIST identificadas usando eluidos de digestiones directas de mAb de NIST sometidos a columnas CSH LC o nanoLC de flujo regular o eluidos de mAb de NIST ProteoMiner™ digeridos sometidos a columnas de nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

Ejemplo 10. ProteoMiner™ aumenta la cantidad de VS detectados en comparación con la digestión directa y la LC o nanoLC de flujo regular

[0220] La cantidad de variaciones de secuencia de aminoácidos de mAb NIST identificadas (SVA > 0,01 %) utilizando eluidos de digestiones directas de mAb NIST sometidas a columnas CSH LC o nanoLC de flujo regular fue menor que los eluidos de mAb NIST ProteoMiner™ digeridos sometidos a columnas nanoLC, como se muestra en la FIG. 22A. Si bien el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación puede enriquecer determinadas proteínas VS, el método generalmente mejora la detección de proteínas VS incluso sin enriquecimiento. Además, nanoLC mejoró la sensibilidad para detectar proteínas VS. La FIG. 22B muestra el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido triptico detectados en un eluido de una digestión directa de mAb de NIST sometida a una columna de LC CSH de flujo regular (inferior), y el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido triptico de glicina a ácido aspártico VS detectados (SVA tan bajo como 0,004%) en un eluido de una digestión de mAb NIST enriquecido con ProteoMiner™ sometido a una columna nanoLC (superior), de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0221] Se utilizaron mAb VS NIST de serina, glicina y valina para evaluar más a fondo el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación. La FIG. 22C muestra la cantidad de variaciones de secuencia de serina, glicina y valina de mAb NIST identificadas usando eluidos de digestiones directas de mAb de NIST sometidas a columnas CSH LC o nanoLC de flujo regular o digestiones de mAb de NIST enriquecidos con ProteoMiner™ sometidos a columnas de nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa. La FIG. 22C muestra que se podrían detectar aproximadamente un 50 % más de VS usando digestiones directas sometidas a columnas nanoLC o digestiones de mAb NIST de eluido ProteoMiner™ sometidas a columnas nanoLC que digestiones directas sometidas a columnas CSH LC de flujo regular. La FIG. 22D muestra la cantidad de variaciones de secuencia de serina, glicina o valina de mAb NIST identificadas por tres laboratorios usando eluidos de digestiones directas de mAb de NIST sometidas a columnas CSH LC de flujo regular o eluidos de mAb de NIST enriquecidos con ProteoMiner™ digeridos sometidos a columnas de nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa. La FIG.

22D muestra que aproximadamente el 85 % de los VS se detectaron usando el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación, y que aproximadamente el 92,3 % de los VS se detectaron usando el método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación,
 5 nanoLC o una combinación de estos.

[0222] La FIG. 22E muestra las variaciones de secuencia de alanina a treonina, glicina a ácido aspártico, serina a asparagina, valina a leucina o isoleucina, arginina a lisina y lisina a arginina de mAb NIST identificadas por tres laboratorios usando eluidos de digestiones directas de mAb de NIST sometidas a columnas CSH LC de flujo regular o digestiones directas de mAb NIST o digestiones de mAb NIST enriquecidas con ProteoMiner™ sometidas a columnas nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa. El método ProteoMiner™ para la detección mejorada de proteínas VS de la presente divulgación o nanoLC detectó 15 de los 17 mAb VS NIST detectados sometiendo digestiones directas de mAb NIST a columnas CSH LC de flujo regular.
 10 Además, la FIG. 22E muestra que 1 de los 17 mAb VS NIST detectados sometiendo digestiones directas de mAb NIST a columnas CSH LC de flujo regular mostró un porcentaje de VS mayor usando nanoLC, mientras que otros mostraron una abundancia relativa similar.

Ejemplo 11. NanoLC puede provocar una sobreestimación del SVA

[0223] La FIG. 23 muestra picos insaturados (inferior) y saturados (superior) en el espectro de masas MS2 de iones de productos de péptido tríptico (por ejemplo, VVSVLTVLHQDWLNGK y TTPPVLDSDGSFEYSK) y de iones de productos de péptido tríptico VS de serina a asparagina (por ejemplo, VVNVLTVLHQDWLNGK y TTPPVLDSDGSFEYNK) detectado en un eluido de un eluido de mAb NIST ProteoMiner™ digerido sometido a una columna nanoLC, de acuerdo con una modalidad ilustrativa. Los picos saturados en el espectro de masas MS2 de iones de productos peptídicos VS y no VS pueden oscurecer la abundancia relativa de proteínas VS y no VS, lo que lleva a una sobreestimación de la abundancia relativa de un SVA.
 25

Ejemplo 12. NanoLC puede mejorar los espectros de MS2

[0224] NanoLC puede mejorar los espectros de MS2 aumentando la señal. Por ejemplo, la FIG. 24 muestra que el análisis de un eluido de una digestión directa de

mAb de NIST sometido a una columna CSH LC de flujo regular usando un espectrómetro de masas produce picos más grandes en el espectro de masas MS2 de iones de productos de péptido tríptico (Scan 9602, $z=3$) que en el espectro de masas MS2 de iones del producto péptido tríptico de cisteína a serina VS (Scan 9515, $z=3$). Por el contrario, el análisis de un eluido de un eluido de mAb NIST ProteoMiner™ digerido sometido a una columna nanoLC usando un espectrómetro de masas produce picos más pequeños en el espectro de masas MS2 de iones de productos de péptido tríptico (Scan 59496, $z=3$) que en el espectro de masas MS2 de iones del producto de péptido tríptico cisteína a serina VS (Scan 59579, $z=3$) de acuerdo con una modalidad ilustrativa.

[0225] NanoLC también puede mejorar los espectros de MS2 al permitir la generación de iones y. Por ejemplo, la FIG. 25 muestra que un espectrómetro de masas no genera iones y en el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico VS de serina a leucina o isoleucina usando un eluido de una digestión directa de mAb de NIST sometida a una columna de LC CSH de flujo regular (Scan 14203, $z=4$). Por el contrario, un espectrómetro de masas genera iones y en el espectro de masas MS2 de iones de producto de péptido tríptico VS de serina a leucina o isoleucina utilizando un eluido de un eluido de mAb NIST ProteoMiner™ digerido sometido a una columna nanoLC (Scan 75616, $z=4$) de acuerdo con una modalidad ilustrativa.