

REIVINDICACIONES

Se reivindica lo siguiente:

1. Un método para identificar impurezas de proteína de la célula hospedadora (HCP) en una muestra, que comprende:
 - 5 (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 de HCP;
 - (b) lavar dicho soporte sólido para proporcionar un eluido que comprende al menos
10 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 todas las proteínas en dicho eluido;
 - 15 (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.
2. El método de la reivindicación 1, donde dicho soporte sólido se lava usando un
20 tensioactivo, donde dicho tensioactivo es un tensioactivo de transferencia de fase, un tensioactivo iónico, un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico o combinaciones de estos.
3. El método de la reivindicación 2, donde dicho tensioactivo es desoxicolato de sodio, laurilsulfato de sodio, dodecibencenosulfonato de sodio o combinaciones de
25 estos.
4. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de dicho tensioactivo es aproximadamente 12 mM.
5. El método de la reivindicación 3, donde dicho tensioactivo comprende aproximadamente 12 mM de desoxicolato de sodio y aproximadamente 12 mM de
30 laurilsulfato de sodio.
6. El método de la reivindicación 1, donde una concentración de dicho 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 mayor que una concentración de dicha al menos una impureza de HCP.

7. El método de la reivindicación 1, donde dichos ligandos peptídicos que interactúan son una biblioteca de ligandos hexapeptídicos combinatorios.

8. El método de la reivindicación 1, donde dicho 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 proteína de fusión, una proteína recombinante, un producto farmacéutico proteico o un medicamento.

9. El método de la reivindicación 1, donde una enzima de dicha condición de digestión enzimática es tripsina.

10. El método de la reivindicación 9, donde dicha condición de digestión enzimática incluye tripsina en una proporción de enzima a sustrato inferior a aproximadamente 1:200.

11. El método de la reivindicación 10, donde dicha 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.

12. El método de la reivindicación 1, donde dicha al menos una impureza de HCP enriquecida no se somete a desnaturalización antes de ser sometida a dicha condición de digestión enzimática.

13. El método de la reivindicación 1, donde dicho 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.

14. El método de la reivindicación 1, donde dicho 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).

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende además

cuantificar dicha al menos una impureza de HCP enriquecida usando dicho espectrómetro de masas, donde un límite de detección de dicha al menos una impureza de HCP enriquecida es aproximadamente 0,003 a 0,006 ppm.

16. 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 contiene al menos un péptido o proteína de tipo silvestre 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 al menos un componente de al menos un péptido o proteína VS enriquecido a un sistema de cromatografía líquida para producir un segundo eluido;
 - (e) someter dicho segundo eluido 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 para identificar dicho al menos un péptido o proteína VS enriquecido en dicha muestra.
17. El método de la reivindicación 16, donde dicha condición de digestión enzimática es una digestión directa.
18. El método de la reivindicación 17, donde dicho sistema de cromatografía líquida comprende una columna de cromatografía líquida a nanoescala (nanoLC) o una columna híbrida de superficie cargada (CSH) de flujo regular.
19. El método de la reivindicación 18, donde dicha condición de digestión enzimática no digiere completamente todas las proteínas en dicho primer eluido.
20. El método de la reivindicación 19, donde dicho soporte sólido se lava usando un tensioactivo, donde dicho tensioactivo es un tensioactivo de transferencia de fase,

un tensioactivo iónico, un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico o combinaciones de estos.

21. El método de la reivindicación 20, donde dicho tensioactivo es desoxicolato de sodio, laurilsulfato de sodio, dodecylbencenosulfonato de sodio o combinaciones de estos.

22. El método de la reivindicación 19, donde la concentración de dicho tensioactivo es aproximadamente 12 mM.

23. El método de la reivindicación 20, donde dicho tensioactivo comprende aproximadamente 12 mM de desoxicolato de sodio y aproximadamente 12 mM de laurilsulfato de sodio.

24. El método de la reivindicación 19, donde una concentración de dicho al menos un péptido o proteína más abundante de tipo silvestre 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 dicho al menos un péptido o proteína VS.

25. El método de la reivindicación 19, donde dichos ligandos peptídicos que interactúan son una biblioteca de ligandos hexapeptídicos combinatorios.

26. El método de la reivindicación 19, donde dicho al menos un péptido o proteína más abundante de tipo silvestre y dicho 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 o un medicamento.

27. El método de la reivindicación 19, donde una enzima de dicha condición de digestión enzimática es tripsina.

28. El método de la reivindicación 27, donde dicha condición de digestión enzimática incluye tripsina en una proporción de enzima a sustrato inferior a aproximadamente 1:200.

29. El método de la reivindicación 28, donde dicha 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.

30. El método de la reivindicación 19, donde dicho al menos un péptido o proteína

VS enriquecido no se somete a desnaturalización antes de ser sometido a dicha condición de digestión enzimática.

31. El método de la reivindicación 19, donde dicho 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 dicho sistema de cromatografía líquida.

32. El método de la reivindicación 19, donde dicho 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).

33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 32, que comprende además cuantificar dicho al menos un péptido o proteína VS enriquecido usando dicho espectrómetro de masas, donde un límite de detección de dicho al menos un péptido o proteína VS enriquecido es aproximadamente 0,003 a 0,006 ppm.

34. Un método para identificar impurezas de proteína de la célula hospedadora (HCP) en una muestra, que 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 de 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 todas las proteínas en dicho eluido;

(d) identificar dicho al menos un componente de dicha al menos una impureza de HCP enriquecida usando espectrometría de masas de monitoreo de reacción paralela;

y

(e) usar la identificación de dicho al menos un componente para identificar dicha al menos una impureza de HCP enriquecida.

35. El método de la reivindicación 34, donde dicho soporte sólido se lava usando un tensioactivo, donde dicho tensioactivo es un tensioactivo de transferencia de fase, un tensioactivo iónico, un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico o combinaciones de estos.
- 5 36. El método de la reivindicación 35, donde dicho tensioactivo es desoxicolato de sodio, laurilsulfato de sodio, dodecylbencenosulfonato de sodio o combinaciones de estos.
37. El método de la reivindicación 34, donde la concentración de dicho tensioactivo es aproximadamente 12 mM.
- 10 38. El método de la reivindicación 36, donde dicho tensioactivo comprende aproximadamente 12 mM de desoxicolato de sodio y aproximadamente 12 mM de laurilsulfato de sodio.
39. El método de la reivindicación 34, donde una concentración de dicho al menos un péptido o proteína de alta abundancia es al menos aproximadamente 1000 veces,
- 15 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 menos una impureza de HCP.
40. El método de la reivindicación 34, donde dichos ligandos peptídicos que
- 20 interactúan son una biblioteca de ligandos hexapeptídicos combinatorios.
41. El método de la reivindicación 34, donde dicho 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 proteína de fusión, una proteína recombinante, un producto farmacéutico proteico o
- 25 un medicamento.
42. El método de la reivindicación 34, donde una enzima de dicha condición de digestión enzimática es tripsina.
43. El método de la reivindicación 42, donde dicha condición de digestión enzimática incluye tripsina en una proporción de enzima a sustrato inferior a
- 30 aproximadamente 1:200.
44. El método de la reivindicación 43, donde dicha 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.

- 5 45. El método de la reivindicación 34, donde dicha al menos una impureza de HCP enriquecida no se somete a desnaturalización antes de ser sometida a dicha condición de digestión enzimática.
- 10 46. El método de la reivindicación 34, donde dicho 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.
47. El método de la reivindicación 34, donde la muestra incluye un estándar interno.
48. El método de la reivindicación 47, donde dicho estándar interno está marcado con un isótopo pesado.
49. El método de la reivindicación 48, donde dicho estándar interno es hPLBD2.