



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 505**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03745158 .0**
96 Fecha de presentación : **20.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1495056**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

54 Título: **Métodos para analizar isómeros de disulfuro de anticuerpos.**

30 Prioridad: **20.03.2002 US 366350 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2011

73 Titular/es: **UCB PHARMA, S.A.**
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE

72 Inventor/es: **Mozier, Ned, M.;**
Dufield, Robert, L.;
Mo, Jianming y
Bild, Gary, S.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 505 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para analizar isómeros de disulfuro de anticuerpos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a isómeros de disulfuro de proteínas recombinantes y a métodos analíticos para detectar los isómeros de disulfuro y formas oxidadas de metionilo de los anticuerpos. Más específicamente, se refiere a isómeros de disulfuro de un anticuerpo que tiene especificidad hacia determinantes antigénicos del factor de necrosis tumoral alfa humano (TNF α). La presente invención también se refiere a métodos analíticos para detectar los isómeros de disulfuro del anticuerpo de TNF α y formas oxidadas de metionilo de los anticuerpos de TNF α . La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden los isómeros y a usos terapéuticos del anticuerpo.

Antecedentes de la invención

15 En una molécula de anticuerpo, hay dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada y cada cadena ligera tienen en su extremo N-terminal un dominio variable. Cada dominio variable está compuesto por cuatro regiones estructurales (FRs) que se alternan con tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Los residuos en los dominios variables están numerados convencionalmente según un sistema ideado por Kabat y otros. Este sistema se describe en Kabat y otros, 1987, en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Departamento de Salud y de Servicios Humanos de EE.UU., NIH, EE.UU. (de aquí en adelante, "Kabat y otros (*supra*)"). Este sistema de numeración se emplea en la presente memoria descriptiva, a no ser que se indique de otro modo.

20 Las designaciones de los residuos según Kabat no se corresponden siempre directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que, en la numeración estricta de Kabat, se corresponden con un acortamiento o a una inserción de un componente estructural, tanto estructural como CDR, de la estructura básica del dominio variable. La numeración correcta de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado, mediante la alineación de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo, con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

25 Las CDRs del dominio variable de la cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (CDRH1), los residuos 50-55 (CDRH2) y los residuos 95-102 (CDRH3), según la numeración de Kabat.

Las CDRs del dominio variable de la cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (CDRL1), los residuos 50-56 (CDRL2) y los residuos 89-97 (CDRL3), según la numeración de Kabat.

30 La construcción de anticuerpos injertados con CDR se describe en el documento de solicitud de patente europea EP-A-0239400, que describe un procedimiento en el cual las CDRs de un anticuerpo monoclonal de ratón se injertan en las regiones estructurales de los dominios variables de una inmunoglobulina humana, mediante mutagénesis dirigida al sitio, usando oligonucleótidos largos. Las CDRs determinan la especificidad de la unión con el antígeno de los anticuerpos y son secuencias peptídicas relativamente cortas que se encuentran en las regiones estructurales de los dominios variables.

35 El primer trabajo sobre anticuerpos monoclonales humanizados mediante el injerto de CDRs, se realizó con anticuerpos monoclonales que reconocían antígenos sintéticos, tales como NP.

40 Sin embargo, ejemplos en los cuales un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la lisozima y un anticuerpo monoclonal de rata que reconoce un antígeno en los linfocitos T humanos, que se humanizaron mediante el injerto de CDRs, han sido descritos por Verhoeyen y otros (Science, 239,1534-1536, 1988) y Riechmann y otros (Nature, 332, 323-324, 1988), respectivamente.

45 Riechmann y otros observaron que la transferencia solo de las CDRs (tal y como las definió Kabat (Kabat y otros (*supra*) y Wu y otros, J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970)) no era suficiente para proporcionar una actividad satisfactoria de unión al antígeno en el producto injertado con CDR. Se observó que una cantidad de residuos estructurales se tienen que alterar de modo que se correspondan a los de la región estructural del donante. Los criterios propuestos para seleccionar qué residuos estructurales se tienen que alterar, se describen en el documento de Solicitud de Patente Internacional WO 90/07861.

Se ha publicado una variedad de revisiones que tratan sobre anticuerpos con injertos de CDRs, que incluyen a Vaughan y otros (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

50 El TNF α es una citocina proinflamatoria que se libera e interacciona con células del sistema inmunitario. Así, el TNF α es liberado por macrófagos que se han activado con lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas. Como tal, el TNF α parece ser un mediador endógeno de gran importancia, implicado en el desarrollo y la patogénesis del choque endotóxico asociado con septicemia bacteriana. El TNF α también se ha observado que tiene una expresión incrementada en una variedad de enfermedades humanas, que incluyen enfermedades crónicas, tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y esclerosis múltiple. Ratones transgénicos para TNF α humano

producen niveles elevados de TNF α de forma constitutiva y desarrollan una poliartritis destructiva espontánea que se asemeja a la artritis reumatoide (Kaffer y otros, EMBO J., 10, 4025-4031,1991). Por lo tanto, se hace referencia al TNF α como una citocina proinflamatoria.

5 Los anticuerpos monoclonales contra TNF α se han descrito en la técnica anterior. Meager y otros, (Hybridoma, 6,305-311, 1987) describen anticuerpos monoclonales de múrido contra TNF α recombinante. Fendly y otros, (Hybridoma, 6, 359-370,1987) describen el uso de anticuerpos monoclonales de múrido contra TNF α recombinante, para definir epítomos neutralizantes sobre TNF. Shimamoto y otros, (Immunology Letters, 17, 311-318, 1988) describen el uso de anticuerpos monoclonales de múrido contra TNF7 y su uso en la prevención del choque endotóxico en ratones. Además, en el documento de Solicitud de Patente Internacional WO 92/11383, se describen anticuerpos recombinantes, que incluyen anticuerpos injertados con CDR, específicos para TNF α . Rankin y otros, (British J. Rheumatology, 34, 334-342,1995) describen el uso de tales anticuerpos injertados con CDR, en el tratamiento de la artritis reumatoide. El documento US-A-5 919 452 describe anticuerpos quiméricos anti-TNF y su uso para tratar patologías asociadas con la presencia de 5 TNF.

15 Los anticuerpos para TNF α se han propuesto para la profilaxis y el tratamiento del choque endotóxico (Beutler y otros, Science, 234, 470-474,1985). Bodmer y otros, (Critical Care Medicine, 21, págs. 441-446, 1993) y Wherry y otros, (Critical Care Medicine, 21, págs. 436-440, 1993) describen el potencial terapéutico de anticuerpos anti-TNF α en el tratamiento del choque séptico. El uso de anticuerpos anti-TNF α en el tratamiento del choque séptico, también está descrito por Kirschenbaum y otros, (Critical Care Medicine, 26, 1625-1626, 1998). La artritis inducida con colágeno se puede tratar con eficacia usando un anticuerpo monoclonal anti-TNF α (Williams y otros (PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992)).

20 Niveles incrementados de TNF α se han encontrado en el líquido sinovial y en la sangre periférica de pacientes que sufren artritis reumatoide. Cuando se administran agentes que bloquean TNF α a pacientes que padecen artritis reumatoide, se reduce la inflamación, mejoran los síntomas y se retarda la lesión de las articulaciones (McKown y otros (Arthritis Rheum., 42,1204-1208, 1999).

25 El uso de anticuerpos anti-TNF α en el tratamiento de la artritis reumatoide y de la enfermedad de Crohn, se describe en Feldman y otros, (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998), Adorini y otros, (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997) y en Feldman y otros, (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997). Los anticuerpos para TNF α utilizados en tales tratamientos son generalmente anticuerpos quiméricos, tales como los descritos en el documento US-A5919452.

30 Dos productos que bloquean el TNF α están autorizados actualmente para el tratamiento de la artritis reumatoide. El primero, llamado etanercept, está comercializado por Immunex Corporation como Enbrel[®]. Es una proteína de fusión recombinante que comprende dos dominios del receptor soluble p75 de TNF, ligados a la porción Fc de una inmunoglobulina humana. El segundo, llamado infliximab, está comercializado por Centocor Corporation como Remicade[®]. Es un anticuerpo quimérico que tiene dominios variables anti-TNF α de múrido y dominios constantes de IgG1 humana.

35 Las moléculas de anticuerpos recombinantes anti-TNF α de la técnica anterior tienen generalmente una afinidad reducida hacia TNF α , comparada con los anticuerpos a partir de los cuales se obtienen las regiones variables o las CDRs, generalmente se tienen que producir en células de mamífero y tienen una preparación costosa. Anticuerpos anti-TNF α de la técnica anterior, están descritos por Stephens y otros, (Immunology, 85, 668-674, 1995), los documentos GB-A-2 246 570 y GB-A-2 297 145.

40 El documento WO 01/94585 describe moléculas de anticuerpo que tienen una afinidad elevada hacia TNF α y una inmunogenicidad reducida en los seres humanos, que se pueden utilizar de forma repetida y se pueden producir fácil y eficazmente, para tratar enfermedades inflamatorias crónicas.

45 Se ha descrito un método para la proteólisis en sistemas de disolventes orgánico-acuoso mezclados (Russell, WK y otros, Anal. Chem. 73: 2682-2685, 2001). Sin embargo, la proteólisis de fragmentos de anticuerpo, tales como Fabs presenta problemas excepcionales. La diferencia entre el método de la presente invención y el método de Russell y otros, es el orden de adición de los disolventes. En el método presente, Fab fue disuelto en acetonitrilo directamente y a continuación se añadieron el tampón de digestión y la enzima. En el método de Russell y otros, se mezclaría primero el disolvente orgánico y el tampón, después se añadirían la proteína y la enzima a la solución. Sin embargo, 50 el método de Russell y otros, no se digería Fab de forma eficaz, debido a la estructura plegada compacta de Fab.

Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de CDP870, el apareamiento con puentes disulfuro intramoleculares, el apareamiento intermolecular predominante con puentes disulfuro entre las cadenas ligera y pesada y la cisteína para la conjugación con PEG.

La Figura 2 muestra el fragmento Lys-C diseñado de la pareja de disulfuros de CDP870 y el fragmento Lys-C de la pareja de isómeros de disulfuro de CDP870, en donde se destacan los residuos decisivos (cys-214 de la cadena ligera, cys-221 de la cadena pesada y cys-227 de la cadena pesada). Las flechas indican el patrón de escisión de Lys-C.

5 La Figura 3 muestra los fragmentos trípticos que contienen metionina de CDP870 en verde.

La Figura 4 muestra el Mapa Tríptico de Oxidación de la metionina para CDP870. Los fragmentos trípticos en donde los residuos de metionilo están oxidados, se describen como O1- O5. Por ejemplo, el fragmento tríptico M1, cuando está oxidado, se describe como O1, M2 como O2, etc.

10 La Figura 5 muestra el Mapa de Lys-C para el isómero de disulfuro de CDP870. La prueba de un fragmento de 1260,5 uma más numeroso en relación con el fragmento de 1411,6 uma, es evidente.

Resumen de la invención

15 La presente invención se refiere a un método para detectar isómeros de disulfuro de anticuerpos que comprende las etapas de pretratar el anticuerpo con un disolvente orgánico, digerir el anticuerpo con una proteasa y analizar los fragmentos. La presente invención también se refiere a métodos analíticos para detectar los isómeros de disulfuro y las formas oxidadas de metionilo de los anticuerpos de TNF α .

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona la reivindicación 1.

20 Otra realización de la presente invención es un método para analizar la caracterización y la cuantificación de isómeros de disulfuro, oxidaciones de metionilo, truncamientos, desamidación de asparaginas, incorporaciones indebidas, extensiones u otras degradaciones comunes de las proteínas o impurezas proteicas en proteínas recombinantes. Preferentemente, la proteína es un anticuerpo. Más preferentemente, el anticuerpo tiene especificidad hacia TNF α . Más preferentemente, el anticuerpo de TNF α es CDP870, tal y como se describe en el documento WO 01/94585.

25 La presente invención es una nueva vía para digerir un fragmento de PEG-anticuerpo para la caracterización analítica que incluye, pero no está limitado a los mismos, un fragmento Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂ o Fv; un monómero o un dímero de cadena ligera o de cadena pesada; un anticuerpo de cadena sencilla, y en este caso CDP870. Estos compuestos son muy difíciles de digerir con proteasas convencionales, debido al hecho de que el PEG impide por lo visto el acceso de las enzimas proteolíticas al esqueleto proteico. Esto se resolvió determinando el efecto de disolventes orgánicos en cantidades precisas en la mezcla de reacción. Se descubrió que el acetonitrilo y otros eran capaces de modificar la estructura tridimensional de forma suficiente para que se permitiera la digestión completa. Basándose en esos descubrimientos, CDP870 se podía digerir con una variedad de proteasas, incluyendo Lys-C, y la proteína digerida se analizó mediante HPLC, espectrometría de masas y otros medios. Esta técnica se aplicó a CDP870 y se encontró una isoforma de disulfuro en aproximadamente el 10-20% que comprendía material en el que el residuo de cisteína N-terminal de la cadena ligera estaba ligado al residuo de cisteína 227 de la cadena pesada.

35 El método de análisis comprende las etapas de pretratar la proteína recombinante con un disolvente orgánico, digerir la proteína pretratada con una proteasa en presencia del disolvente orgánico y un medio para analizar los fragmentos de la digestión de la proteasa. Preferentemente, el disolvente orgánico es acetonitrilo. Preferentemente, la proteasa es tripsina para la oxidación de los residuos de metionilo y Lys-C para los isómeros de disulfuro.

40 Preferentemente, los medios para el análisis es la HPLC de fase inversa. El método de análisis se empleó para analizar y cuantificar isómeros de disulfuro y oxidaciones de metionilo, pero también se podía utilizar para el análisis de truncamientos, desamidaciones de asparagina, incorporaciones indebidas, extensiones u otras degradaciones comunes de las proteínas o de impurezas de las proteínas.

45 Aunque la invención anterior se ha descrito con detalle a modo de ilustración y como ejemplo para una mejor comprensión, para una persona experta en la técnica será evidente, teniendo en cuenta las explicaciones de esta invención, que se pueden realizar cambios y modificaciones sin salir del espíritu y del alcance de la presente invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan solo para fines de ejemplificación y no están destinados a limitar el alcance de la invención, que se ha descrito de modo general arriba.

Ejemplos

Ejemplo 1

Método para detectar un isómero de disulfuro

50 Se preparó una solución de proteína de reserva, diluyendo CDP870 hasta 20 mg/ml o Fab' de CDP870 hasta 10 mg/ml en tampón acetato 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5,5. La Lys-C se adquirió de Wako (Osaka, Japón), se preparó a 1 mg/ml en Tris 100 mM, pH 8,5.

Pretratamiento con acetonitrilo

Se mezclaron 20 µl de la muestra diluida con 40 µl de acetonitrilo, se mezcló brevemente en vórtex y se dejó reposar durante 5 minutos.

Digestión con Lys-C

- 5 Se añadieron 130 µl de Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, se mezclaron y a continuación se combinaron con 10 µl de una solución de reserva de Lys-C. La mezcla de la digestión con Lys-C se incubó a 37°C durante aproximadamente 12-16 horas.

HPLC de fase inversa

- 10 El material digerido no se enfría rápidamente y se inyectaron 50 µl directamente en la columna de HPLC (Phenomenex Jupiter 300 angstroms, 5 µ, 2,1 mm x 250 mm) usando un caudal: 0,5 mL/minuto. La longitud de onda de la detección era 214 nm. La fase móvil era A, 0,1% de TFA en agua y B, 0,1% de TFA en acetonitrilo. El gradiente (sistema binario) era del modo siguiente:

Tiempo	Fase móvil B
0 min	0%
3 min	6%
8 min	10%
9 min	11%
21 min	15%
21,1 min	95%
27 min	95%
27,1 min	0%

La Figura 5 muestra el Mapa de Lys-C del isómero de disulfuro para CDP870

- 15 Ejemplo 2

Método para detectar la oxidación de metionina

Una solución de proteína de reserva se preparó diluyendo CDP870 hasta 20 mg/ml o Fab' de CDP870 hasta 10 mg/ml en tampón acetato 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5,5. La solución de tripsina se adquirió en Promega (Madison WI) con una concentración de tripsina de 0,4 mg/ml en tampón de ácido acético 50 mM.

- 20 Pretratamiento con acetonitrilo

Se mezclaron 200 µl de la muestra diluida con 200 µl de acetonitrilo, se mezcló brevemente en vórtex y se dejó reposar durante 5 minutos.

Digestión con tripsina

- 25 Se añadieron 500 µl de tampón de digestión (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 8,5), se mezclaron y a continuación se combinaron con 100 µl de una solución de reserva de tripsina. La mezcla de la digestión con tripsina se incubó a 37°C durante aproximadamente 12-16 horas.

HPLC de fase inversa

- 30 El material digerido se enfrió rápidamente con 100 µl de HCl 1,0 N y se inyectó directamente en la columna de HPLC (HPLC (Zorbax 300SB-C18 (Bodman; Aston, PA) 3,5 µ, 4,6 mm x 15 cm) usando un caudal: 0,5 mL/minuto. La longitud de onda de la detección era 214 nm. La fase móvil era A, 0,1% de TFA en agua y B, 0,1% de TFA en acetonitrilo. El gradiente (sistema binario) era del modo siguiente:

Tiempo	Fase móvil B	
0 min	16%	
15 min	25%	lineal
25 min	27%	lineal
50 min	42%	lineal
52 min	90%	lineal
60 min	90%	retención
63 min	16%	lineal
78 min	16%	retención

La Figura 4 muestra el Mapa tríptico de oxidación de metionina para CDP870

Ejemplo 3

Método de afinidad hacia TNF α

5 Se preparó una columna de afinidad hacia TNF α , acoplado TNF α humana recombinante (Biosource International, CA*) con medio UltraLink[®] de Biosupport (Pierce, Rockford, IL), según las instrucciones del producto. El TNF α se disolvió en tampón de acoplamiento, citrato sódico 0,6 M, CHES 50 mM, pH 9,0. Para preparar una columna de 1 mL, se incubaron 0,126 g (peso seco) de UltraLink[®] de Biosupport con 750 μ l de TNF α en el tampón de acoplamiento. La reacción se incubó durante 72 horas a temperatura ambiente con mezclado. Las perlas se centrifugaron empleando una microcentrífuga 5415 de Eppendorf, a 1000 rpm, 4°C durante 5 minutos. El material sobrenadante se decantó y la resina se resuspendió en 10 ml de tampón de enfriamiento para incubar durante 2,5 horas a temperatura ambiente en un vial cónico con tapa de rosca de 15 ml con inversión suave, tal y como se ha descrito previamente. El tampón de enfriamiento era etanolamina 3 M, pH 9,0. Después de enfriar rápidamente, el vial cónico se centrifugó durante 10 minutos (como arriba), y el material sobrenadante se decantó y la resina se resuspendió en 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4 (Invitrogen[®] life technologies, Carlsbad, CA) durante 20 minutos, a temperatura ambiente con inversión suave. Las perlas lavadas se centrifugaron durante 10 minutos (como arriba), el material sobrenadante se decantó, y las perlas se suspendieron de nuevo en 10 ml de cloruro sódico 1 M y se incubaron durante 20 minutos, a temperatura ambiente con mezclado suave. Las perlas se centrifugaron de nuevo, el material sobrenadante se decantó, y las perlas se resuspendieron en 10 ml de PBS, pH 7,4. Esto se mezcló durante 20 minutos, y esta etapa se repitió una vez más. A continuación, las perlas se resuspendieron en 4 ml de PBS, pH 7,4 y se vertieron en una columna HR 5/5. La columna resultante de 1 ml se equilibró en 50 volúmenes de columna (cv) de tampón A. El tampón A es HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4.

25 La columna se equilibró, se cargó, se lavó, se eluyó y se limpió con 0,5 ml/min en línea en un AKTA Explorer 100 Air con UV900, pH, temperatura, y metros de conductividad y el sistema operativo de Unicorn 4.0 y el programa de análisis. La columna se equilibró y se lavó en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. La columna se cargó con CDP870 (36426803, 200 mg/ml de reserva) que se diluyó hasta 2 mg/ml con el tampón A y se inyectaron 0,5 ml/serie. La columna se eluyó de forma isocrática con glicina 100 mM, pH 3,4. La columna se limpió con HEPES 10 mM, NaCl 2 M, pH 7,4. Después de cargar, se recogieron las fracciones de flujo a través (no unido) y también las fracciones eluidas (unidas), y también la fracción eluida (unida). Estas dos fracciones y el material de alimentación de la columna se analizaron mediante digestión con Lys-C, seguida por espectrometría de masas. El perfil del mapa del péptido mostraba cantidades similares de péptidos correspondientes al isómero n° 1 en todas las muestras, sugiriendo que las especies del isómero n° 1 no eran diferentes de las parentales, en relación a la unión a TNF α .

Listado de Secuencias

<110> CELLTECH R&D LIMITED

35 <120> ISÓMEROS DE DISULFURO DE ANTICUERPOS, USO DE LOS MISMOS Y MÉTODOS PARA ANALIZAR LOS MISMOS

<130> P037674EP

<140> 03745158.0

<141> 20-03-2003

40 <150> U.S. 60/366350

<151> 20-03-2002

<160> 2

<170> SeqWin99, versión 1.02

45 <210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Cadena ligera de CDP870

<400> 1

ES 2 358 505 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5 <210> 2
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cadena pesada de CDP870
 <400> 2

ES 2 358 505 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Ala Ala
 225

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método de análisis para la caracterización y la cuantificación de isómeros de disulfuro de fragmentos de anticuerpo que comprenden las etapas de: (a) pretratar el fragmento de anticuerpo con un disolvente orgánico, (b) digerir el fragmento de anticuerpo pretratado con una proteasa en presencia de un disolvente orgánico y (c) analizar los fragmentos de la digestión con proteasa.
- 2.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho disolvente orgánico es acetonitrilo.
- 3.- El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha concentración de acetonitrilo en la etapa de pretratamiento (a) está entre aproximadamente 40% y 80%.
- 10 4.- El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha concentración de acetonitrilo en la etapa de pretratamiento (a) es de aproximadamente 67%.
- 5.- El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha concentración de acetonitrilo en la etapa de digestión con proteasa (b) está entre aproximadamente 20% y 50%.
- 6.- El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha concentración de acetonitrilo en la etapa de digestión con proteasa (b) es de aproximadamente 20%.
- 15 7.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteasa es Lys-C o tripsina.
- 8.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos fragmentos de la digestión con proteasa se analizan empleando HPLC de fase inversa.
- 20 9.- El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho fragmento de anticuerpo se selecciona entre el grupo consistente en: un fragmento Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂ o Fv; un monómero o un dímero de cadena ligera o de cadena pesada; y un anticuerpo de cadena sencilla.
- 10.- El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho fragmento de anticuerpo es un Fab.
- 11.- El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho Fab es CDP870.
- 25 12.- Un método de análisis para la caracterización y la cuantificación de productos de la degradación de fragmentos de anticuerpo y de impurezas de fragmentos de anticuerpo en proteínas recombinantes seleccionadas entre el grupo consistente en oxidaciones de metionilo, truncamientos, desamidación de asparaginas, incorporaciones indebidas, extensiones u otras degradaciones comunes de las proteínas o impurezas proteicas que comprenden las etapas de: (a) pretratar la proteína con un disolvente orgánico, (b) digerir la proteína pretratada con una proteasa en presencia del disolvente orgánico y (c) analizar los fragmentos de la digestión con proteasa.
- 30 13.- El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha concentración de acetonitrilo en la etapa de pretratamiento (a) es de aproximadamente 50%.
- 14.- El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha concentración de acetonitrilo en la etapa de digestión con proteasa (b) es de aproximadamente 20%.

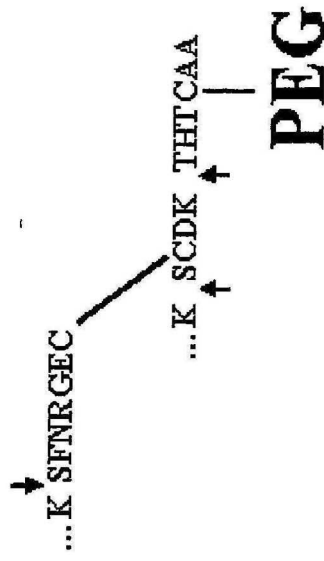
FIG 1

Cadena ligera
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASFLYSGVPYRFSGSGGTD FILLTISSLQP EDFATYYCQQ YNINPLTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG

LSSPYTK\$FNRGEC SEQ ID NO:1
Cadena pesada
EYQLVESGGGLVQPFGSLRLSCAASGYVFTDYG MNWVRQAPGKGLEWMGW
INTYIGEPIYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARGY
RSYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGT AALGCLYKDY
FPEPVTYSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKYDKKVEPKSCDKTHTCA A SEQ ID NO:2
PEG

FIG 2

Isómero más abundante, fragmento Lys-C = 1260.5 amu



Isómero menos abundante, fragmento Lys-C = 1411.6 amu

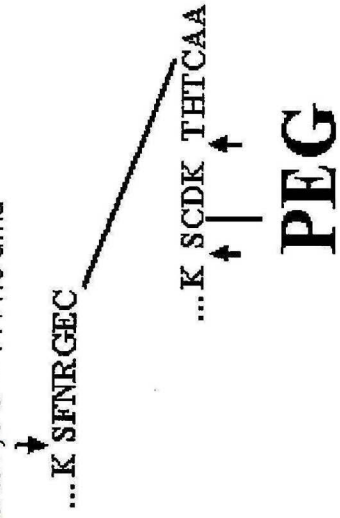


FIG 3

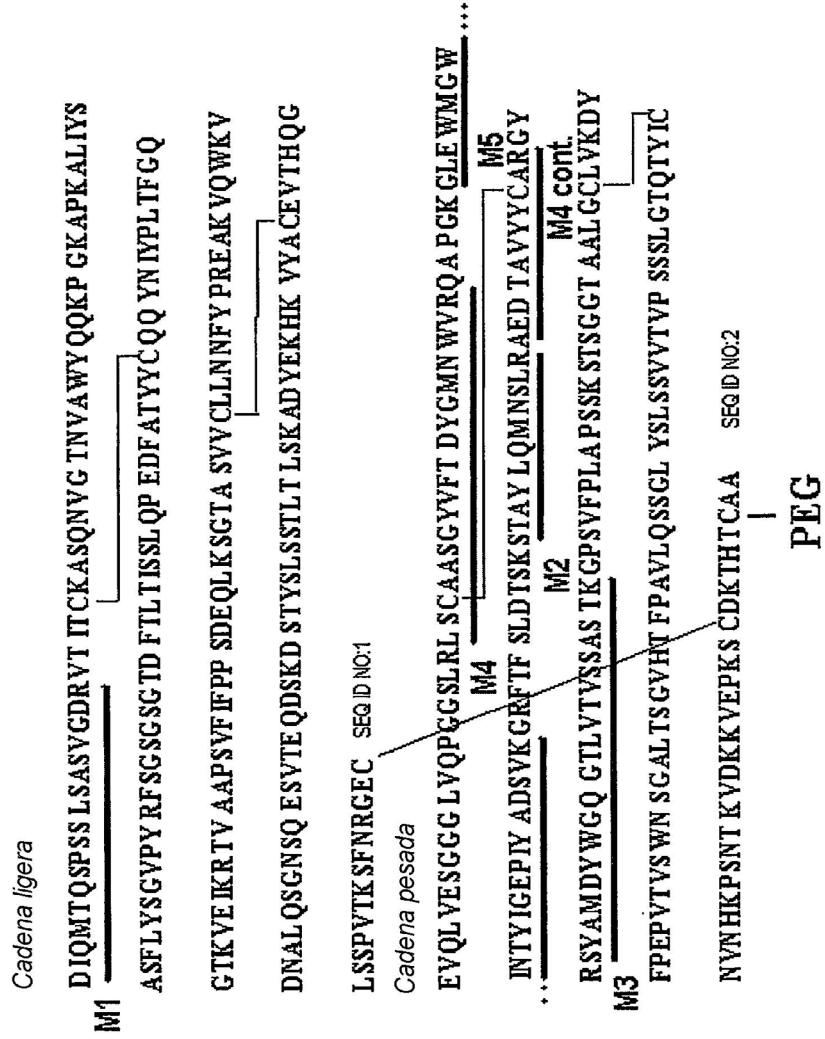


FIG 4

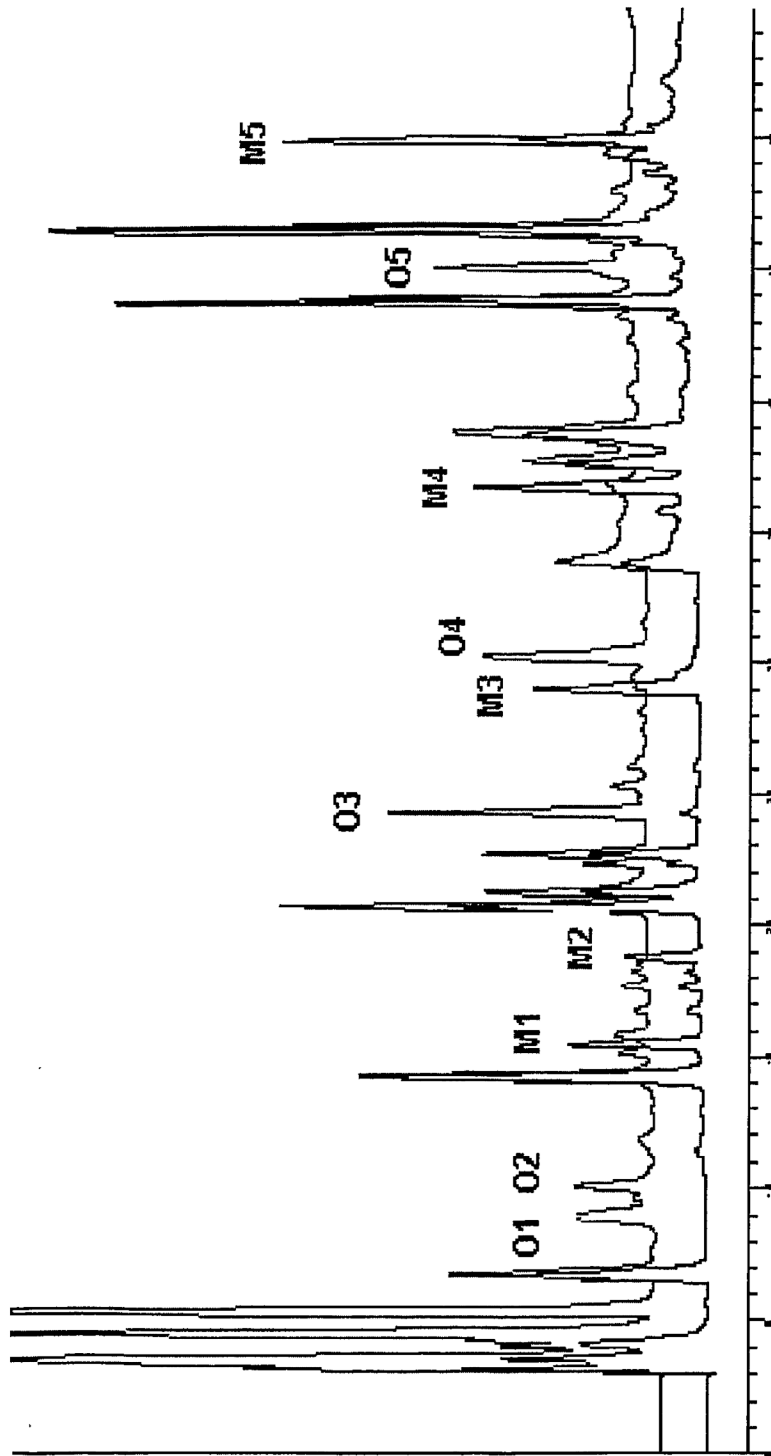


FIG 5

