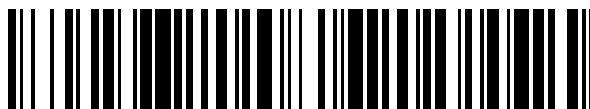


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 742**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2008** **PCT/US2008/087934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2009** **WO09086262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008** **E 08868946 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016** **EP 2223108**

54 Título: **Métodos para diferenciar en una muestra proteína derivada de plasma de proteína recombinante**

30 Prioridad:

27.12.2007 US 17091 P

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

26.10.2016

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark, Opfikon, CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

WEBER, ALFRED;
TURECEK, PETER y
SCHWARZ, HANS-PETER

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 587 742 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 diferenciar en una muestra proteína derivada de plasma de proteína recombinante

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere, en general, a métodos para diferenciar y cuantificar en una muestra proteína derivada de plasma y proteína recombinante, usando un ensayo de unión específico de glicosilación.

10 **Antecedentes de la invención**

La glicosilación es el proceso, o el resultado, de la adición de carbohidratos (sacáridos) a proteínas y lípidos. El proceso de glicosilación es una modificación cotraduccional y posterior a la traducción que se produce durante la síntesis de proteínas de membrana y secretadas. La mayoría de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso (RE) experimentan glicosilación (Brooks *et al.*, Expert Rev Proteomics 3: 345-59, 2006). La glicosilación es un proceso específico del sitio, dirigido por enzimas, que tiene dos tipos de unión específicos, la glicosilación unida a N y la glicosilación unida a O. Los carbohidratos unidos a N se unen a través de la N-acetilglucosamina unida al aminoácido asparagina en una secuencia consenso del aminoácido "Asn-X- Ser /Thr". Los aminoácidos circundantes a menudo dictan qué tipo de glicosilación, si la hubiera, se producirá. Por ejemplo, si el aminoácido en la parte media de la secuencia consenso es prolina (Pro), no se produce glicosilación unida a N. La mayoría de las uniones covalentes a proteínas del carbohidrato unido a O implican una unión entre el monosacárido N-acetilgalactosamina y los aminoácidos serina o treonina (Werner *et al.*, Acta Paediatrica 96: 17-22, 2007). No hay secuencia consenso para glicosilación unida a O.

La glicosilación en proteína puede dar como resultado cualquier adición de residuos de azúcar sencillos tales como manosa y glucosa, o adición de residuos de azúcar más complejos tales como ácido siálico y fucosa (Brooks *et al.*, Expert Rev Proteomics 3: 345-59, 2006) y azúcares de cadena ramificada. La glicosilación de proteína sirve para varias funciones *in vivo*, incluyendo la estabilización de la proteína en el citoplasma, el aumento de la semivida de la proteína, así como la regulación de la actividad de la proteína o enzima que tiene los residuos de glicosilo (Werner *et al.*, Acta Paediatrica 96: 17-22, 2007). Por lo tanto, es importante asegurarse de que las proteínas expresan la glicosilación correcta o la actividad de la proteína se puede ver comprometida o estará ausente. El tipo de glicosilación en una proteína a menudo depende del tipo de célula en la que se sintetiza la proteína, así como las especies de células que sintetizan la proteína (Werner *et al.*, mencionado anteriormente; Brooks *et al.*, mencionado anteriormente). Por ejemplo, las bacterias y la levadura no sintetizan glicanos complejos que por lo general se encuentran en proteínas eucariotas superiores (Brooks *et al.*, mencionado anteriormente). Incluso dentro de las especies de mamíferos (por ejemplo, ser humano y hámster) y de células tumorales a células normales, no malignas, los patrones de glicosilación pueden ser diferentes (Werner *et al.*, mencionado anteriormente). Por lo tanto, el tipo de sistema celular en el que se produce la proteína tiene una influencia significativa en el producto glicosilado resultante (Werner *et al.*, mencionado anteriormente).

Las proteínas producidas de forma recombinante han proporcionado una mejora significativa para el estudio de proteínas en entornos tanto clínicos como de investigación. La producción a gran escala de proteínas recombinantes ha permitido el estudio de la actividad de la proteína *in vitro* y las proteínas recombinantes se han usado recientemente como agentes terapéuticos es el entorno clínico. Por ejemplo, la interleuquina-2 recombinante se ha administrado a pacientes con cáncer para reforzar el sistema inmunitario después de la quimioterapia, y factores de crecimiento recombinantes, tales como hormona del crecimiento humano, eritropoyetina y factor de estimulación de colonias de granulocitos y factores sanguíneos, tales como Factor VIII y Factor VII, se usan en el tratamiento de diversos trastornos.

Aunque las proteínas recombinantes proporcionan una ventaja como proteínas terapéuticas, ellas también presentan ciertos inconvenientes. Puede ser difícil producir cantidades suficientes de proteína recombinante para su uso terapéutico en células humanas de una manera rentable, y la proteína recombinante preparada en células tales como *Escherichia coli* y otras bacterias no necesariamente se pliegan de forma correcta, no se glicosilan y/o se deben manipular una vez aisladas para preparar proteínas en una forma activa en el cuerpo humano. Además, la glicosilación de proteínas en células humanas a menudo es más compleja que la que se observa en los sistemas de expresión de proteínas usados normalmente, tales como bacterias, insectos e incluso mamíferos más elevados. Por ejemplo, células de insecto tales como *Spodoptera* rara vez generan proteínas que tengan una estructura del azúcar de orden más elevado de los tipos producidos en mamíferos (Altmann *et al.*, Glycoconjugate J 16: 109-123, 1999). Además, aunque la mayoría de los mamíferos expresan azúcares de orden más elevado que comprenden estructuras tales como fucosa y residuos de ácido siálico, estos residuos de azúcar pueden no estar unidos químicamente de la misma manera que los azúcares en proteínas producidas en células humanas (Jenkins *et al.*, Nature Biotechnology 14: 975-981, 1996; documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.047.335).

La administración de proteínas terapéuticas se usa a menudo con el fin de corregir una deficiencia o defecto funcional en la proteína expresada de forma endógena. La insulina recombinante y análogos de insulina (Vajo *et al.*, Pharmacol Rev. 52: 1-9, 2000) se administran a pacientes diabéticos para compensar la falta de insulina producida

de manera natural El Factor VIII recombinante y análogos de secuencia del Factor VIII se administran a pacientes que padecen hemofilia A para corregir una deficiencia en los niveles del Factor VIII dando como resultado una coagulación sanguínea anómala (Gruppo *et al.*, Haemophilia. 9: 251-60, 2003). En las terapias recombinantes de estos tipos, es útil determinar los niveles de proteína recombinante en suero u otra muestra con el fin de determinar la semivida del fármaco y otros factores farmacocinéticos, tales como absorción, en el paciente. Sin embargo, puede ser difícil determinar la diferencia entre la proteína endógena y la proteína recombinante, ya que son esencialmente la misma proteína.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de desarrollar métodos para diferenciar la cantidad de proteína de origen natural de la proteína exógena en una muestra y para detectar los niveles de proteína recombinante endógena y exógena administrada a un paciente con el fin de que los regímenes de tratamiento se puedan optimizar.

Sumario de la Invención

La presente invención se refiere en general a métodos para diferenciar la presencia de proteína derivada de plasma en una muestra de una proteína producida de forma recombinante en la muestra, cuando la proteína derivada de plasma y la proteína recombinante son esencialmente la misma proteína, mediante el aprovechamiento de la diferencia en los patrones de glicosilación entre proteínas del plasma y proteínas recombinantes. La invención también proporciona un método para cuantificar los niveles de proteína derivada de plasma en una muestra usando la expresión de un residuo de carbohidrato en particular.

En un aspecto, la invención proporciona un método para cuantificar la cantidad de proteína derivada de plasma (pdP) y proteína recombinante (rP) en una muestra, en el que la proteína derivada de plasma y la proteína recombinante son la misma proteína con diferentes patrones de glicosilación, dando lugar dichos diferentes patrones de glicosilación a diferentes grados de unión a lectina para la proteína derivada de plasma en comparación con la proteína recombinante, en el que la proteína total (tP) en dicha muestra se determina previamente y es igual a las cantidades combinadas de proteína derivada de plasma y proteína recombinante (pdP + rP), comprendiendo dicho método las etapas de: (a) calcular una diferencia entre la unión a lectina para dicha muestra y la unión a lectina esperada para una muestra hipotética de volumen igual que tiene una cantidad de proteína igual a tP, en el que la unión a lectina esperada se determina a partir de una curva patrón de unión a lectina frente a cantidades crecientes de proteína recombinante, y, (b) representar la diferencia de (a) en una curva de calibración para determinar la cantidad de proteína recombinante (rP) en dicha muestra, en el que la curva de calibración es una representación de la diferencia entre la unión a lectina esperada, calculada al igual que en (a), y unión a lectina observada para mezclas que contienen cantidades conocidas de pdP y rP, como una función de cantidades crecientes de proteína recombinante (rP) en dichas mezclas, teniendo cada una de dichas mezclas una cantidad constante de pdP.

En una realización, la etapa de cálculo comprende poner en contacto la muestra con una composición de lectina, en la que la lectina está etiquetada con una etiqueta detectable. La etapa de cálculo comprende adicionalmente detectar la composición de la lectina etiquetada usando métodos descritos en el presente documento en la descripción detallada.

En una realización más, el método se refiere a que la cantidad de proteína total se determina previamente midiendo la cantidad de proteína recombinante y proteína derivada de plasma en una muestra. La cantidad de proteína total se mide usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como, en un aspecto, un ensayo de inmunoabsorción unido enzimas (ELISA). En una realización relacionada, la unión a lectina esperada de una muestra se determina suponiendo que toda la cantidad total de proteína en la muestra es proteína derivada de plasma y mediante extrapolación de la cantidad de unión a lectina esperada basándose en esa cantidad de proteína derivada de plasma.

En una realización adicional, el método se refiere a que la curva de calibración se prepara antes de la cuantificación de la cantidad de la proteína derivada de plasma y la proteína recombinante en una muestra. Se contempla que la curva de calibración se representa como la diferencia entre i) la unión a lectina esperada de una muestra que contiene una cantidad total conocida de proteína recombinante y derivada de plasma y ii) la unión a lectina observada para las mezclas que contienen cantidades conocidas de pdP y rP, representada como una función de cantidades crecientes de rP en dichas muestras, con cada una de dichas muestras teniendo una cantidad constante de pdP.

En una realización relacionada, la lectina es cualquier lectina, como se describe en el presente documento que demuestra una unión específica a un residuo de azúcar encontrado en una proteína derivada de plasma humano y no en la proteína recombinante. En una realización específica, la lectina es aglutinina de *Sambucus Nigra* (SNA).

Además se contempla que la lectina está etiquetada con una etiqueta detectable. En una realización, la etiqueta detectable se selecciona entre el grupo que consiste en un fluoróforo, una etiqueta radiactiva, un reactivo con densidad electrónica, una enzima, biotina, digoxigenina, un hapteno, o un agente quimioluminiscente. En una realización relacionada, la etiqueta es biotina.

Además se contempla que la muestra se deriva de una muestra biológica de un sujeto. En una realización, la muestra es una muestra de sangre. En una realización relacionada, la muestra es plasma. Además en otra realización, la muestra es suero.

5 La invención también se refiere a que la proteína derivada de plasma y la proteína recombinante son esencialmente la misma proteína, es decir, tienen por lo general la misma estructura y función del aminoácido. En una realización, la proteína es una proteína terapéutica, en la que, en diversos aspectos, la proteína se selecciona entre el grupo que
10 consiste en una citoquina, un factor de crecimiento, un factor de coagulación sanguínea, una enzima, una quimioquina, un receptor de superficie celular soluble, una molécula de adhesión celular, un anticuerpo, una hormona, una proteína del citoesqueleto, una proteína de la matriz, una proteína chaperona, una proteína estructural, una proteína metabólica, y cualquier otra proteína terapéutica conocida por los expertos en la materia. En una realización más, la proteína es un factor de coagulación sanguínea. Además, en una realización adicional, el
15 factor de coagulación sanguínea se selecciona entre el grupo que consiste en factor de von Willebrand (vWF), Factor VIII (FVIII), Factor VII, y Factor IX (FIX).

En otro aspecto de la invención, la proteína recombinante se produce en una célula hospedadora que carece de una o más glicosiltransferasas de modo que la proteína recombinante presenta un patrón de glicosilación diferente en
20 comparación con el patrón de glicosilación de la proteína derivada de plasma. En diversas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de bacteria, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de plantas, o una célula de mamífero. En una realización relacionada, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

El método de la invención proporciona la detección de una diferencia en los patrones de glicosilación entre proteína
25 producida de forma recombinante y proteína derivada de plasma de origen natural. En una realización, la proteína derivada de plasma comprende un residuo de carbohidrato que no se encuentra en la proteína recombinante, en la que el residuo de carbohidrato se selecciona entre los residuos de carbohidrato conocidos en la técnica y expuestos en el presente documento en la descripción detallada. En una realización relacionada, la proteína derivada de
30 plasma comprende un ácido α 2,6-neuramínico y la proteína recombinante carece de ácido α 2,6-neuramínico.

En un aspecto más de la invención, el método comprende opcionalmente poner en contacto la muestra con un agente de unión específico para la proteína antes de poner en contacto la muestra con la composición de lectina. En una realización, el agente de unión es un ligando, receptor soluble, un anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un
35 cofactor, u otra proteína que se una a la proteína derivada de plasma o proteína recombinante con especificidad.

En un aspecto relacionado, el método se refiere a que el agente de unión o la proteína derivada de plasma están
unidos a un soporte sólido. En diversas realizaciones, el soporte sólido se selecciona entre el grupo que consiste en un filtro, una membrana, incluyendo una membrana de cloruro de polivinilo (PVC), una membrana de fluoruro de polivinilideno (PDVF), una membrana de poliamida, una placa, incluyendo una placa de PVC, una placa de
40 poliestireno, y cualquier otra placa que se una a una proteína, un microvehículo, una macro perla en fase sólida, una perla magnética y una perla de polisiloxano/alcohol polivinílico.

En una realización más, el agente de unión a proteína o proteína derivada de plasma están en solución.

45 El método de la invención comprende opcionalmente el uso de un agente de bloqueo para prevenir unión no específica de la proteína lectina a la muestra. El método contempla que la muestra se pone en contacto con el agente de bloqueo después de poner en contacto la muestra con el agente de unión. En una realización, el agente de bloqueo se selecciona entre el grupo que consiste en albúmina en suero, gelatina, soluciones de glicosidasa, agentes de modificación de carbohidrato, tales como agentes de acetilación o agentes de metilación, y una solución
50 de oxidación de carbohidrato. En una realización, la solución de oxidación de carbohidrato es una solución de peryodato.

En otro aspecto de la invención, se contempla que un método mencionado en el presente documento utiliza una proteína recombinante que es un fragmento, variante o análogo de la proteína derivada de plasma.

55 La invención también proporciona un método para diferenciar proteína derivada de plasma de proteína recombinante en una muestra que comprende, poner en contacto la muestra con una composición que comprende una lectina específica para un residuo de carbohidrato en la proteína derivada de plasma; detectar la unión de la lectina a la proteína derivada de plasma; y comparar la cantidad de unión de lectina unida a proteína en la muestra con respecto
60 a una curva de unión de lectina:proteína para determinar la cantidad de proteína derivada de plasma en la muestra.

En una realización, la lectina es proteína de aglutinina de *Sambucus Nigra* (SNA). En una realización relacionada, la lectina está etiquetada con una etiqueta detectable como se describe en el presente documento.

65 En otro aspecto más, la invención proporciona un kit para cuantificar los niveles de proteína derivada de plasma y proteína recombinante en una muestra, en el que la proteína derivada de plasma y la proteína recombinante

codifican la misma proteína, y el kit comprende, un agente de unión; una composición que comprende una lectina específica para un carbohidrato en la proteína derivada de plasma y una etiqueta detectable, y un patrón de proteína. En una realización, el kit comprende opcionalmente un agente de bloqueo.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debería entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, solamente se proporcionan a modo de ilustración, dado que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación de una curva de calibración de cuatro puntos que correlaciona la diferencia en la unión a SNA esperada y observada en una muestra con la cantidad de proteína recombinante.

La Figura 2 es una representación de una curva de calibración de ocho puntos que correlaciona la diferencia en la unión a SNA esperada y observada en una muestra con la cantidad de proteína recombinante.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere, en general, a métodos para diferenciar proteína derivada de plasma de proteína producida de forma recombinante en una muestra basándose en la diferencia en la glicosilación de proteína entre los dos tipos de proteínas. La invención también contempla métodos para cuantificar la cantidad de proteína derivada de plasma en una muestra que comprende tanto proteína recombinante como proteína derivada de plasma, en los que la proteína derivada de plasma y la proteína recombinante comprende la misma, o esencialmente la misma, secuencia de aminoácidos.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Las siguientes referencias proporcionan a una persona con experiencia una definición general de muchos de los términos usados en la presente invención: Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2ª ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 5ª ED., R. Rieger, *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991).

Cada publicación, solicitud de patente, patente, y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorpora por referencia en su totalidad hasta el punto en el que no sea incoherente con la presente divulgación.

En el presente documento se indica que, como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique de otro modo.

Como se usa en el presente documento, un "polipéptido" se refiere a un polímero formado por residuos de aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos. Los polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado. El término "proteína" por lo general se refiere a polipéptidos grandes. El término "péptido" por lo general se refiere a polipéptidos cortos. Como se usa en el presente documento, polipéptido proteína y péptido se usan indistintamente.

Como se usa en el presente documento, un "fragmento" de un polipéptido se refiere a cualquier parte del polipéptido más pequeña que el polipéptido de longitud completa o producto de expresión de proteína. Los fragmentos por lo general son análogos de delección del polipéptido de longitud completa en el que uno o más residuos de aminoácido se han retirado del extremo amino terminal y/o el extremo carboxi terminal del polipéptido de longitud completa. Por consiguiente, los "fragmentos" son un subconjunto de análogos de delección que se describen a continuación.

Como se usa en el presente documento, un "análogo" se refiere a un polipéptido sustancialmente similar en su estructura y que tiene la misma actividad biológica, aunque en ciertos casos hasta un grado diferente, al de una molécula de origen natural. Los análogos se diferencian en la composición de sus secuencias de aminoácidos en comparación con el polipéptido de origen natural del que se deriva el análogo, basándose en una o más mutaciones que implican (i) delección de uno o más residuos de aminoácidos en uno o más extremos del polipéptido y/o una o más regiones internas de la secuencia del polipéptido de origen natural, (ii) inserción o adición de uno o más aminoácidos en uno o más extremos (por lo general un análogo de "adición") del polipéptido y/o una o más regiones internas (por lo general un análogo de "inserción") de la secuencia del polipéptido de origen natural o (iii) sustitución de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos en la secuencia del polipéptido de origen natural. Las

sustituciones pueden ser conservativas o no conservativas basándose en la relación fisicoquímica o funcional del aminoácido que se está reemplazando y el aminoácido que lo reemplaza.

5 Como se usa en el presente documento, una "variante" se refiere a una proteína o análogo de la misma que se modifica para que comprenda residuos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Tales residuos pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, etc, de la molécula. Como alternativa, los residuos pueden disminuir la toxicidad de la molécula y eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable de la molécula, etc. Residuos capaces de mediar efectos de este tipo se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980). En la técnica se conocen bien procedimientos para acoplar tales residuos a una molécula. Por ejemplo, la variante puede ser un factor de coagulación sanguínea que tenga una modificación química que confiera una semivida más larga *in vivo* a la proteína. En ciertos aspectos, las variantes son polipéptidos que se modifican mediante glicosilación, pegilación, o polisialilación.

15 Como se usa en el presente documento, "de origen natural", como se aplica a una proteína o polipéptido, se refiere al hecho de que la proteína se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo virus) que se puede aislar de una fuente de la naturaleza y que no se ha sido modificada de forma intencionada por el hombre en el laboratorio es de origen natural. Las expresiones "de origen natural" y "de tipo silvestre" se usan indistintamente en todo el documento.

20 Como se usa en el presente documento, "derivado de plasma" como se aplica a una proteína o polipéptido, se refiere a un polipéptido o fragmento del mismo de origen natural que se encuentra en plasma, en sangre o suero de un sujeto. Una proteína derivada de plasma también puede ser una proteína de origen natural y una proteína de tipo silvestre.

25 Como se usa en el presente documento, "son la misma proteína o esencialmente la misma proteína" se refiere a una proteína de origen natural (por ejemplo, una proteína derivada de plasma) que también se puede expresar de manera recombinante mediante ingeniería genética, dando como resultado una proteína recombinante que tiene la misma o esencialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína derivada de forma natural. Una proteína recombinante que es la misma proteína que una proteína derivada de plasma, producida de forma natural incluye fragmentos, análogos y variantes de la proteína recombinante de longitud completa.

30 Como se usa en el presente documento, "unión a lectina esperada" se refiere a la unión a lectina hipotética de una muestra cómo se determina mediante la suposición de que toda la cantidad total de proteína en la muestra es proteína derivada de plasma, y mediante extrapolación de la cantidad de unión a lectina esperada basándose en la cantidad hipotética de proteína derivada de plasma cuando se compara con una curva de unión patrón de lectina:proteína.

35 Como se usa en el presente documento, un "residuo detectable", "etiqueta detectable" o "etiqueta" se refiere a una composición detectable con medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, o químicos. Por ejemplo, etiquetas útiles incluyen ^{32}P , ^{35}S , colorantes fluorescentes, reactivos con densidad electrónica, enzimas (por ejemplo, como se usan normalmente en un ELISA), biotina-estreptavidina, dioxigenina, haptenos y proteínas para las que hay disponibilidad de anti-sueros o anticuerpos monoclonales, o moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana. El residuo detectable a menudo genera una señal que se puede medir, tal como una señal radiactiva, cromogénica, o fluorescente, que se puede usar para cuantificar la cantidad de residuo detectable unido en una muestra.

40 Como se usa en el presente documento, los términos "expresar", "que expresa" y "expresión" se refieren a que permiten o hacen que la información en un gen o secuencia de ADN se llegue a manifestar, por ejemplo mediante la producción de una proteína mediante activación de las funciones celulares implicadas en la transcripción y la traducción de un gen o secuencia de ADN correspondientes. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula hospedadora para formar un "producto de expresión" tal como una proteína. También se puede decir que el producto de expresión por sí mismo, por ejemplo, la proteína resultante, es "expresado" o "producido" por la célula hospedadora.

55 **Fragmentos, variantes y análogos**

Los métodos de la invención son útiles para detectar rápidamente proteínas recombinantes en una muestra, así como fragmentos, variantes o análogos de la proteína recombinante, y además pueden ser útiles para detectar proteína de origen natural que puede existir como fragmentos o variantes alélicas *in vivo* en la que se pueden detectar diferencias de glicosilación.

60 En la técnica se conocen bien métodos para preparar fragmentos, variantes o análogos de polipéptidos. Los fragmentos de un polipéptido se preparan usando métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen escisión enzimática (por ejemplo, tripsina, quimiotripsina) y también usando medios recombinantes para generar un fragmento de polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos específica. Se pueden generar fragmentos que comprendan un dominio de unión a ligando, un dominio de unión a receptor, un dominio de dimerización o

multimerización, o cualquier otro dominio identificable conocido en la técnica.

También se conocen bien métodos para preparar análogos de polipéptido. Los análogos pueden ser sustancialmente homólogos o sustancialmente idénticos al polipéptido de origen natural del que se deriva el análogo, y los análogos contemplados por la invención son aquellos que retienen al menos una parte de la actividad biológica del polipéptido de origen natural.

Por lo general, análogos de sustitución intercambian un aminoácido del tipo silvestre por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y se pueden diseñar para que modulen una o más propiedades de polipéptido, tales como estabilidad frente a la escisión proteolítica, sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones de este tipo por lo general son conservativas. Por "sustitución de aminoácido conservativa" se hace referencia a la sustitución de un aminoácido por un aminoácido que tiene una cadena lateral de un carácter químico similar. Aminoácidos similares para hacer sustituciones conservativas incluyen los que tienen una cadena lateral ácida (ácido glutámico, ácido aspártico); una cadena lateral básica (arginina, lisina, histidina); una cadena lateral de amida polar (glutamina, asparagina); una cadena lateral alifática, hidrófoba (leucina, isoleucina, valina, alanina, glicina); una cadena lateral aromática (fenilalanina, triptófano, tirosina); una cadena lateral pequeña (glicina, alanina, serina, treonina, metionina); o una cadena lateral de hidroxilo alifático (serina, treonina).

Un experto en la materia puede generar fácilmente análogos y fragmentos de polinucleótido para codificar fragmentos biológicamente activos, variantes o mutantes de la molécula de origen natural que posee la misma actividad biológica o similar a la de la molécula de origen natural. Métodos practicados de forma rutinaria incluyen técnicas de PCR, digestión enzimática de ADN que codifica la molécula de proteína y ligación a secuencias de polinucleótidos heterólogos, y similares. Por ejemplo, la mutagénesis puntual, usando PCR y otras técnicas bien conocidas en la técnica, se pueden usar para identificar con particularidad qué residuos de aminoácidos son importantes en actividades en particular asociadas con la actividad de la proteína. Por lo tanto, un experto en la materia será capaz de generar cambios de bases individuales en la hebra de ADN para dar como resultado un codón alterado y una mutación de sentido erróneo.

Además se contempla que la proteína o polipéptido se pueden modificar para preparar un análogo que es una proteína de fusión que comprende un segundo agente que es un polipéptido. En una realización, el segundo agente que es un polipéptido es una enzima, un factor de crecimiento, una citoquina, una quimioquina, un receptor de superficie celular, el dominio extracelular de un receptor de superficie celular, una molécula de adhesión celular, o fragmento o dominio activo de una proteína descrita anteriormente o de cualquier otro tipo de proteína conocida en la técnica. En una realización relacionada, el segundo agente es un factor de coagulación sanguínea tal como Factor VIII, Factor VII, Factor IX y factor de von Willebrand. La proteína de fusión contemplada se prepara mediante técnicas químicas o recombinantes bien conocidas en la técnica.

Variantes de proteína contempladas incluyen polipéptidos modificados de manera química con técnicas tales como ubiquitinación, glicosilación, conjugación a agentes terapéuticos o de diagnóstico, etiquetado (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), unión covalente a polímero tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol), introducción de enlaces no hidrolizables, e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que no se produce normalmente en proteínas humanas. Las variantes retienen las propiedades de unión de moléculas modificadas de la invención.

La preparación de variantes pegiladas de un polipéptido, fragmento o análogos por lo general comprenderá las etapas de (a) hacer reaccionar el polipéptido con polietilenglicol (tal como un éster reactivo o derivado aldehídico de PEG) en condiciones con las que el polipéptido de construcción de unión se llega a unir a uno o más grupos PEG, y (b) obtener el producto(s) de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán basándose en parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la proporción de PEG:proteína, mayor será el porcentaje del producto poli-pegilado. En algunas realizaciones, la construcción de unión tendrá un solo residuo de PEG en el extremo N-terminal. El polietilenglicol (PEG) se puede unir a la proteína para proporcionar una semivida más larga *in vivo*. El grupo PEG puede tener cualquier peso molecular conveniente y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular medio del PEG variará de aproximadamente 2 kiloDalton ("kDa") a aproximadamente 100 kDa, más de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, lo más de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa. Los grupos PEG por lo general se unirán al factor de coagulación sanguínea a través de acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo natural o modificado por ingeniería en el residuo de PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, tiol, o éster) a un grupo reactivo en el factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, o éster).

Variantes de polipéptido adicionales útiles en los métodos de la presente invención incluyen polipéptidos que comprenden residuos de polisialilato (PSA). Métodos para preparar polipéptidos polisialilados se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20060160948 y Saenko *et al.*, Haemophilia 12: 42-51, 2006.

Glicosilación

La glicosilación en proteínas humanas está formada por combinaciones de azúcares sencillos y complejos.

Monosacáridos, tales como manosa, glucosa, fucosa, galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, y ácido siálico/ácido neuramínico se combinan en cadenas lineales o ramificadas de aproximadamente dos hasta doce o más monosacáridos (Brooks *et al.*, Expert Rev Proteomics 3: 345-59, 2006). Cada monosacárido puede estar unido a otro residuo de azúcar ya sea con uniones alfa o beta en cualquiera de los carbonos en la estructura siguiente, por ejemplo, unión α 1-3 entre el primer carbono del primer azúcar y el tercer carbono en el azúcar siguiente. La adición de residuos de azúcar se realiza mediante glicosiltransferasas específicas y los azúcares se retiran mediante proteínas glicosidasas específicas de azúcar.

En la N-glicosilación, el residuo de azúcar básico que comprende nueve residuos de manosa, dos residuos de N-acetilgalactosamina y tres residuos de glucosa ($\text{GalNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$) se une a un residuo de asparagina en la proteína. Una vez unido a la proteína, el oligosacárido se recorta para retirar los tres residuos de glucosa terminal y un residuo de manosa. A continuación, la proteína se transporta al aparato de Golgi en el que se produce una modificación adicional posterior a la traducción, por ejemplo, un conjunto de tres residuos adicionales de manosa se retiran dejando un núcleo de azúcar de cinco manosas y dos N-acetilglucosaminas ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$). Este residuo se puede recortar adicionalmente o se pueden añadir residuos adicionales. Varios oligosacáridos de orden superior se basan en una estructura de núcleo que tiene tres azúcares manosa y dos azúcares N-acetilglucosamina. La alta manosa contiene entre 5 y 9 residuos de manosa unidos a la estructura de núcleo. Oligosacáridos complejos comprenden residuos de N-acetilglucosamina sustituidos por residuos de manosa unidos en α 1,3 y α 1,6. Oligosacáridos híbridos comprenden residuos de N-acetilglucosamina en lugar de residuos de manosa unidos en α 1,3. Oligosacáridos unidos a N híbridos y complejos no son sintetizados por organismos sencillos tales como levaduras y bacterias.

La O-glicosilación es un suceso post-traducciona que se produce en el aparato de Golgi y comienza con la unión de un solo monosacárido, por lo general N-acetil galactosamina, pero puede ser una manosa o fucosa, a un grupo OH de un residuo de serina o treonina. La extensión de la cadena adicional se realiza de una manera en etapas, pero no se necesita una estructura de núcleo para la adición como en la glicosilación unida a N (Brooks *et al.*, mencionado anteriormente).

Las bacterias unen residuos de azúcar a proteínas de una manera totalmente diferente a la del proceso en células de mamífero debido a una falta de aparato de Golgi y otros orgánulos. La mayoría de las glicoproteínas bacterianas carecen de residuos de ácido siálico en proteínas N-glicosiladas, o si el ácido siálico está presente, a menudo los residuos ocurren en cadenas de ácido polisialílico similares a las producidas en proteínas de células neuronales humanas (Brooks *et al.*, mencionado anteriormente), pero no en las glicoproteínas habituales. La enzima α 2,3 sialiltransferasa, responsable de la unión del ácido α 2,3 siálico, se ha aislado en *N. gonorrhoeae*. Se ha intentado realizar ingeniería genética para introducir cualquier glicosiltransferasa, bacteriana o humana, en células de bacterias en un intento de producir proteínas con glicosilación más similar a la de las proteínas humanas. En la glicosilación unida a O, los O-glicanos bacterianos están altamente metilados y contienen el azúcar ramnosa que no se encuentra en seres humanos. Además, no es necesario que el primer monosacárido añadido sea GalNAc.

Las levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *S. Cerevisiae*) realizan las primeras etapas de N-glicosilación de manera similar a las células humanas, generando el núcleo de oligosacárido de nueve manosas, tres glucosas, dos N-acetilglucosaminas y uniéndolo a la proteína. El núcleo de nueve manosas a continuación se recorta hasta un núcleo de solamente ocho manosas, dos N-acetilglucosaminas. Esta estructura de ocho manosas no se recorta igual que en las células humanas, pero se puede manosear adicionalmente para que contenga hasta 100 residuos de manosa (Brooks *et al.*, mencionado anteriormente). Se han desarrollado células de *Pichia pastoris* modificadas por ingeniería que expresan enzimas glicosiltransferasa que unen residuos de azúcar de manera que se parece en mayor medida a la unión en las proteínas humanas (Brooks *et al.*, mencionado anteriormente, Gerngross *et al.*, Nat Biotechnol. 22: 1409-14, 2004; Wildt *et al.*, Nat Rev Microbiol 3: 119-128, 2005). Sin embargo, no se ha conseguido la introducción satisfactoria de enzimas sialiltransferasa, lo que deja a la mayoría de las proteínas producidas en células de levadura con una carencia de residuos de sialilo (Brooks *et al.*, mencionado anteriormente). La O-glicosilación de levaduras comienza con un residuo de manosa unido a un residuo de serina o treonina, y se puede extender hasta cinco residuos de manosa en una configuración ya sea ramificada o lineal. La O-glicosilación unida a manosa no se produce en seres humanos.

La glicosilación de las proteínas de células vegetales se diferencia ampliamente de la de los seres humanos. La N-glicosilación en células vegetales comienza igual que en las células humanas, en las que se forma un núcleo de oligosacáridos $\text{GalNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$. Esta estructura del núcleo a continuación se recorta hasta un residuo que tiene de cinco a nueve residuos de manosa y dos residuos de N-acetilglucosamina ($\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$) que se puede prolongar adicionalmente usando azúcares tales como fucosa y xilosa (un azúcar no humano) en disposiciones de unión que no se expresan en células humanas y que pueden ser inmunogénicas para seres humanos. Por lo general, se cree que las glicoproteínas vegetales están sin sialilar, pero se pueden inducir para añadir grupos sialilo en cultivo (Saint-Jore-Dupas *et al.*, Trends in Biotechnol 25: 317-23, 2007). Recientemente se han realizado intentos para producir células vegetales modificadas por ingeniería que expresan la maquinaria necesaria para producir proteínas sialiladas (Paccalet *et al.*, Plant Biotechnol. J 5: 16-25, 2007). Para que las plantas expresen el ácido siálico, todo el grupo de genes humanos responsables de esta glicosilación, incluyendo las ácido siálico sintetetasas, glicosiltransferasas y transportadores, se debe transducir en células vegetales, haciendo difícil la expresión de las proteínas vegetales sialiladas. La glicosilación unida a O en vegetales se puede unir en residuos de serina, treonina o hidroxiprolina.

Glicanos unidos a O en vegetales incluyen los azúcares ramnosa, arabinosa y ácido glucurónico que no se encuentran en seres humanos, así como más estructuras similares a las de los mamíferos, tales como GalNac.

La glicosilación en células de insecto se produce del mismo modo que la de las células vegetales. El núcleo precursor de N-glicano se sintetiza y se añade a las proteínas y se recorta para la estructura del núcleo de tri-manosa. Sin embargo, la modificación adicional por lo general se limita a la adición de residuos de manosa o fucosa (Brooks *et al.*, mencionado anteriormente, Altmann *et al.*, Glycoconjugate J 16: 109-123, 1999). Las células de insecto producen de forma característica proteínas sin sialilar, pero se pueden inducir para que produzcan ácido sialílico en ciertas condiciones de cultivo, y durante ciertas etapas del desarrollo (Brooks *et al.*, mencionado anteriormente; Tomiya *et al.*, Glycoconj J. 21: 343-360, 2004). Se han modificado células de insecto mediante ingeniería para que expresen genes de sialiltransferasa humana con un éxito moderado en la generación de proteínas sialiladas (Aumiller *et al.*, Glycobiology 13: 497-507, 2003). Sin embargo, las células de insecto secretan una enzima sialidasa que puede escindir cualquier residuo de ácido siálico añadido a las proteínas. La glicosilación unida a O es similar a la que se produce en seres humanos.

La glicosilación en células de mamífero no humano, tales como células de riñón de cría de hámster (BHK) y células de ovario de hámster chino (CHO), que son las líneas celulares más prevalentes para producir proteínas terapéuticas a gran escala, a menudo produce proteínas con residuos de glicosilación similares a la proteína humana, pero no exactamente iguales. Por ejemplo, las células CHO expresan un residuo de azúcar similar al ácido siálico diferente y por lo tanto no producen ácido siálico del modo en el que se produce en células humanas (Brooks *et al.*, Ext Rev Proteomics 3: 345-59, 2006); Chenu *et al.*, Biochem Biophys Acta 1622: 133-44, 2003). Además, las células CHO unen el azúcar similar al ácido siálico en una configuración $\alpha 2,3$ que no se expresa en células humanas. Las células CHO modificadas sometidas a ingeniería para expresar la $\alpha 2,6$ sialiltransferasa humana producen de manera satisfactoria proteínas que expresan tanto un ácido $\alpha 2,6$ siálico similar al humano como el ácido $\alpha 2,3$ siálico derivado de hámster (Bragonzi *et al.*, Biochem Biophys Acta 1474: 273-82, 2000). Se sabe poco sobre la O-glicosilación en insectos. Se cree que los insectos O-glicosilan residuos de treonina, y pueden incluir azúcares similares a los de mamífero tales como GalNac, y el disacárido GalNac más galactosa.

Proteínas Lectina

Los residuos de azúcar son unidos de forma específica por las proteínas lectina, que son proteínas que se unen a carbohidrato o glicoproteínas que son altamente específicas para residuos de azúcar particulares. Las proteínas lectina fueron aisladas por primera vez a partir de especies vegetales, por ejemplo, la lectina aglutinina de *Sambucus Nigra* (SNA) se aísla del árbol saúco, y de forma específica se une a residuos de ácido $\alpha 2,6$ siálico (Brinkman-Van der Linden *et al.*, Analytical Biochemistry 303: 98-104, 2002). También se sabe que las proteínas lectina se encuentran en casi todas las especies.

La unión de las lectinas a sus hidratos de carbono correspondientes puede ser dependiente de Ca^{2+} o independiente de Ca^{2+} . Véase el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.225.542. La especificidad del reconocimiento de la lectina de hidratos de carbono es muy específica y por lo tanto es comparable con la especificidad de antígeno de los anticuerpos o la especificidad de sustrato de las enzimas. Por ejemplo, varias lectinas independientes de Ca^{2+} se han aislado de páncreas bovino y de forma específica pueden los β -galactósidos lactosa y asialofetuína y el α -galactósido melibiosa, y también se han identificado para lectinas que se unen a fucosa dependiente de Ca^{2+} .

La lectina aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA, MAL) se une al ácido $\alpha 2,3$ siálico, la aglutinina de *Sambucus Nigra* (SNA) se une al ácido $\alpha 2,6$ siálico, la lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) (Kobata e Yamashita, 1993) y *Lens culinaris* (LcH) (Yamashita *et al.*, 1993) se unen a residuos de fucosa. Varias lectinas vegetales son específicas para la N-acetil- β -D-galactosamina, que es un carbohidrato específico de grupo sanguíneo, y se usan en la determinación del grupo sanguíneo. Las lectinas de animal de tipo C se unen a la N-Acetilgalactosamina. La Limulina y la aglutinina de *Limax flavus* (LFA) interactúan fuertemente con glicoproteínas de cadena de O. (Fischer *et al.*, Glycoconjugate J. 12: 707-13, 2004). Además, se han desarrollado análogos de lectina para imitar la acción de análogos naturales, pero con mayor especificidad (Ferrand *et al.*, Science 318: 619-622, 2007).

Las tablas* que siguen a continuación detallan lectinas conocidas y su especificidad de unión útiles en los métodos de la invención.

Lectinas de unión a manosa			
	Nombre de la lectina	Organismo	Especificidad de Unión
Con A	Concanavalina A	<i>Canavalia ensiformis</i>	estructuras α -manosídicas ramificadas; N-Glicanos de tipo alta manosa, de tipo híbrido y de tipo complejo biantenarico
LCH	Lectina de lenteja	<i>Lens culinaris</i>	Región del núcleo fucosilada de N-Glicanos de tipo complejo bi- y triantenarico
GNA	Lectina de campanilla de invierno	<i>Galanthus nivalis</i>	estructuras de alta manosa unidas en α 1-3 y α 1-6
Lectinas de unión a galactosa / N-acetilgalactosamina			
RCA	Ricino común Aglutinina, RCA ₁₂₀	<i>Ricinus communis</i>	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R
PNA	Aglutinina de Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr (Antígeno T)
AIL	Jacalina	<i>Artocarpus integrifolia</i>	(Sia)Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr (Antígeno T)
VVL	Lectina de veza de vellosa	<i>Vicia villosa</i>	GalNAc α -Ser/Thr (Antígeno Tn)
Lectinas de unión a ácido siálico / N-acetilglucosamina			
WGA	Aglutinina de Germen de Trigo	<i>Triticum vulgaris</i>	GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc, Neu5Ac (ácido siálico)
SNA	Lectina de saúco	<i>Sambucus nigra</i>	Neu5Ac α 2-6Gal(NAc)-R
MAL	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>	<i>Maackia amurensis</i>	Neu5Ac/Gc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R
Lectinas de unión a fucosa			
UEA	Aglutinina de <i>Ulex europaeus</i>	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc α 1-2Gal-R
AAL	Lectina de <i>Aleuria aurantia</i>	<i>Aleuria aurantia</i>	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3/4)Gal β 1-4GlcNAc; R ₂ -GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc-R ₁

Nombre de la lectina	Abreviatura	Especificidad de Unión
<i>Agaricus bisporus</i>	ABA	Fetuína; Gal β 1-3GalNAc
<i>Amaranthus caudatus</i>	ACL	Gal β 1-3GalNAc, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc; Antígeno T
<i>Griffonia simplicifolia lectina I</i>	GSL I	α -N-acetilgalactosamina, α -galactosa

Nombre de la lectina	Abreviatura	Especificidad de Unión
<i>Griffonia simplicifolia</i> lectina II	GSL II	terminal- α,β -GlcNAc; glucógeno
<i>Griffonia simplicifolia</i> I B4	GSL I B4	residuos de α -D-galactosilo
<i>Bauhinia purpurea alba</i>	BPL	Gal β 1-3GalNAc
<i>Codium fragile</i>	CFL	GalNAc
<i>Datura stramonium</i>	DSL	(GlcNAc β 1-4) $_3$ GlcNAc = (Glc β 1-4) $_2$ GlcNAc > Glc β -4GlcNAc >> GlcNAc
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	FP terminal > GalNAc α 1-3GalNAc > GalNAc α 1-3Gal; grupo sanguíneo A (pentasacárido de Forssman: GalNAc α 1-3 GalNAc α 1-3Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc)
<i>Erythrina corallidendron</i>	ECor A	GalNAc/N-acetilactosamina/Lactosa/D-Gal
<i>Euonymos europaeus</i>	EEA	Gal α 1-3(L-Fuc α 1-2)Gal β 1,3/4- β -GlcNAc; Gal α 1-3Gal; estructuras de grupo sanguíneo H
<i>Glycine max</i>	SBA	terminal α,β GalNAc > α,β Gal
<i>Helix aspersa</i>	HAA	residuos de α GalNAc terminal
<i>Helix pomatia</i>	HPA	GalNAc α 1-3GalNAc > α -GalNAc > α -GlcNAc >> α -Gal
<i>Hippeastrum hybrid</i>	HHL	(α 1,3)/(α 1,6) manosa; estructuras de polimánosa; galactomananos de levadura
<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTL	α -L-fucosa
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LEL	(GlcNAc β 1-4) $_3$ GlcNAc > (GlcNAc β 1-4) $_2$ GlcNAc > GlcNAc β 1-4GlcNAc
<i>Maclura pomifera</i>	MPA	Gal β 1-3GalNAc terminal > GalNAc α 1-6Gal
<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	NPA	residuos de α -D-manosilo terminal e interno en glicoconjugados, preferentemente oligomanosas que contienen uniones α 1-6
<i>Phaseolus coccineus</i>	PCA	la aglutinación no se inhibe con monosacáridos pero se inhibe con fetuína
<i>Phaseolus vulgaris</i> L	PHA-L	GlcNAc β 1,2Man, oligosacáridos de complejo triantenario

Nombre de la lectina	Abreviatura	Especificidad de Unión
<i>Phaseolus vulgaris E</i>	PHA-E	Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,6
<i>Phytolacca americana</i>	PWM	oligómeros de N-acetil- β -D-glucosamina
<i>Pisum sativum</i>	PSA, PEA	α -man ramificada, tipo complejo con núcleo de α -fuc unido a N-acetilquitobiosa
<i>Psophocarpus tetragonolobus I</i>	PTL, WBA	α -galactosamina
<i>Solanum tuberosum</i>	STA	oligómeros de N-acetil- β -D-glucosamina
<i>Sophora japonica terminal</i>	SJA	Gal β 1,3GalNAc > Gal β 1,3GlcNAc > $\alpha\beta$,GalNAc > $\alpha\beta$,Gal
<i>Wisteria floribunda</i>	WFA,WFL	N-acetilgalactosamina- α - o β -3 o 6-galactosa terminal

*Tablas adaptadas de Galab Technologies GmbH, Alemania, que mencionan a Gabius, H. J.; Gabius, S. (Eds.): Glycosciences - Status and Perspectives. Weinheim: Chapman y Hall, 1997; Goldstein, *et al.*, Sharon, N.; Goldstein, I. J. (Eds.) The Lectins - Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Orlando: Academic Press, 1986, S. 33-243; Debray *et al.*, Eur. J. Biochem., 117, 41-55, 1981.

Las lectinas descritas anteriormente se pueden usar en los métodos de la invención para diferenciar los patrones de glicosilación de dos proteínas diferentes, que pueden depender de la fuente de expresión de la proteína. Por ejemplo, la proteína SNA, como se muestra a modo de ejemplo en los ejemplos que siguen a continuación, es útil para unir de forma específica proteínas que expresan residuos de ácido α 2,6 a la vez que la proteína MAA se une específicamente a residuos de ácido α 2,3 siálico.

Proteínas recombinantes

En la técnica se conocen bien métodos para preparar proteínas recombinantes. Métodos para producir células, incluyendo células de mamífero, que expresan ADN o ARN que codifica una proteína recombinante se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.048.729, 5.994.129, y 6.063.630. Las enseñanzas de cada una de estas solicitudes se incorporan de forma expresa en el presente documento por referencia en su totalidad.

Una construcción de ácido nucleico usada para expresar un polipéptido o fragmento, variante u análogo del mismo puede ser una que se exprese de forma extracromosómica (de forma episómica) en la célula de mamífero transfectada o una que integre, ya sea de forma aleatoria un sitio diana seleccionado previamente a través de recombinación homóloga, en el genoma de la célula receptora. Una construcción que se expresa de forma extracromosómica comprende, además de secuencias que codifican polipéptidos, secuencias suficientes para expresión de la proteína en las células y, opcionalmente, para replicación de la construcción. Por lo general, incluye un promotor, una secuencia de ADN que codifica polipéptido y un sitio de poliadenilación. El ADN que codifica la proteína se coloca en la construcción de manera tal que su expresión esté bajo el control del promotor. Opcionalmente, la construcción puede contener componentes adicionales tales como uno o más de los siguientes: un sitio de corte y empalme, una secuencia potenciadora, un gen marcador seleccionable bajo el control de un promotor apropiado, y un gen marcador amplificable bajo el control de un promotor adecuado.

En las realizaciones en las que la construcción de ADN se integra en el genoma de la célula, es necesario que incluya solamente las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido. Opcionalmente, puede incluir un promotor y una secuencia potenciadora, un sitio o sitios de poliadenilación, un sitio o sitios de corte y empalme, secuencias de ácidos nucleicos que codifican un marcador o marcadores seleccionables, secuencias de ácidos nucleicos que codifican un marcador amplificable y/o ADN homólogo al ADN genómico en la célula receptora para dirigir la integración del ADN en un sitio seleccionado en el genoma (dirección de ADN o secuencias de ADN).

Células hospedadoras usadas para producir proteínas recombinantes son células de bacteria, levadura, insecto, vertebrado no mamífero, o de mamífero; las células de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, mono, chimpancé, perro, gato, bovino, porcino, ratón, rata, conejo, oveja y ser humano. Las células hospedadoras pueden ser células inmortalizadas (una línea celular) o células no inmortalizadas (primarias o secundarias) y pueden ser cualquiera de una gran diversidad de tipos de células, tales como, pero no limitadas a, fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales mamarias, células epiteliales intestinales), células de ovario (por ejemplo, células de ovario de hámster chino o CHO), células endoteliales, células gliales, células neuronales, elementos formados de la sangre (por ejemplo, linfocitos, células de médula ósea), células musculares, hepatocitos y precursores de estos tipos de células somáticas.

Células hospedadoras usadas normalmente incluyen: células procariotas tales como bacterias gram negativas o gram positivas, es decir, cualquier cepa de *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Salmonella*, y similares; células eucariotas tales como células CHO (ovario de hámster chino); células de riñón de cría de hámster (BHK); células 293 de riñón humano; células COS-7; células de insecto tales como D. Mel-2, Sf4, Sf5, Sf9 y Sf21 y High 5; células vegetales y diversas células de levadura tales como *Saccharomyces* y *Pichia*.

Las células hospedadoras que contienen el ADN o ARN que codifica polipéptido se cultivan en condiciones apropiadas para el crecimiento de las células y la expresión del ADN o ARN. Esas células que expresan el polipéptido se pueden identificar usando métodos conocidos y la proteína recombinante se puede aislar y purificar, usando métodos conocidos; ya sea con o sin amplificación de la producción del polipéptido. La identificación se puede realizar, por ejemplo, a través de identificación sistemática de células de mamífero modificadas genéticamente que presentan un fenotipo indicativo de la presencia de ADN o ARN que codifica la proteína, tal como identificación sistemática por PCR, identificación sistemática mediante análisis de transferencia de Southern, o identificación sistemática para la expresión de la proteína. La selección de células que tienen ADN que codifica proteína incorporado se puede conseguir mediante la inclusión de un marcador seleccionable en la construcción de ADN y el cultivo de células transfectadas o infectadas que contienen un gen marcador seleccionable en condiciones apropiadas para la supervivencia solamente de aquellas células que expresan el gen marcador seleccionable. La amplificación adicional de la construcción de ADN introducida se puede ver influida por el cultivo de células modificadas genéticamente en condiciones apropiadas para la amplificación (por ejemplo, el cultivo de células modificadas genéticamente que contienen un gen marcador amplificable en presencia de una concentración de un fármaco en el que solamente pueden sobrevivir las células que contienen múltiples copias del gen marcador amplificable).

Proteínas recombinantes que pueden ser proteínas terapéuticas incluyen, pero no se limitan a, citoquinas, factores de crecimiento, factores de coagulación sanguínea, enzimas, quimioquinas, receptores de superficie celular solubles, moléculas de adhesión celular, anticuerpos, hormonas, proteínas del citoesqueleto, proteínas de la matriz, proteínas chaperonas, proteínas estructurales, proteínas metabólicas, y otras proteínas terapéuticas conocidas por los expertos en la materia. Proteínas recombinantes a modo de ejemplo que se usan o que se pueden usar como agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, Factor VIII, Factor VII, Factor IX y factor de von Willebrand, eritropoyetina, interferones, insulina, CTLA4-Ig, alfa-glucocerebrosidasa, alfa-glucosidasa, hormona estimulante de folículo, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD52, receptor de TNF, y otras conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Physicians Desk Reference, 62ª Edición, 2008, Thomson Healthcare, Montvale, NJ.

Métodos para detectar proteína en una muestra

Las proteínas terapéuticas a menudo son difíciles de detectar en muestras de suero debido a su similitud con la proteína de origen natural producida de forma endógena. Sin embargo, a menudo es beneficioso determinar la cantidad de un polipéptido terapéutico, fragmento, variante o análogo del mismo que se ha administrado para evaluar si la proteína terapéutica presenta características deseadas tales como una mayor solubilidad o estabilidad, resistencia a la digestión enzimática, aumento de la semivida biológica, y otras características conocidas por los expertos en la materia. El método también permite la detección de los usos autorizados de proteínas terapéuticas que pueden estar protegidos por derechos de propiedad intelectual.

La presente invención proporciona un método para diferenciar las proteínas de origen natural derivadas de plasma de proteínas recombinantes en una muestra, permitiendo de este modo la cuantificación de cada tipo de proteína en una muestra. La capacidad para identificar la cantidad de proteína recombinante en una muestra en el tiempo ayuda en la determinación del agente terapéutico óptimo basándose en la semivida, absorción, estabilidad, etc. El ensayo de detección puede ser un ensayo de inmunoadsorción asociado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de centelleo por proximidad (SPA), resonancia de plasma superficial (SPR), u otros ensayos de unión conocidos en la técnica.

Los métodos de detección establecidos en el presente documento utilizan la diferencia de los patrones de glicosilación entre proteínas derivadas de plasma y los de muchas proteínas producidas de forma recombinante, como se ha descrito anteriormente.

Para detectar la proteína derivada de plasma en una muestra, la mezcla se pone en contacto con una composición

que comprende una proteína lectina descrita en el presente documento que es específica para un residuo de carbohidrato en la proteína derivada de plasma, y se mide la cantidad de proteína derivada plasma unida a lectina. En un aspecto, la etapa de contacto se realiza en un medio líquido tal como un tampón acuoso, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS), PBS sin magnesio/calcio, u otros tampones apropiados como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Protein Science*, Coligan *et al.*, Eds., 1998, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. Se contempla que la puesta en contacto en el método de la invención se realiza durante un periodo de tiempo suficiente para que la unión alcance el equilibrio y por lo general durante un periodo de tiempo en el intervalo de 15 minutos a una noche. Por ejemplo, la mezcla se pone en contacto ya sea con un agente de unión o una proteína lectina, durante 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 24 horas, o un periodo de tiempo apropiado para una unión suficiente del agente de unión o la lectina a la proteína derivada de plasma.

El método incluye opcionalmente al menos una o más etapas de lavado, en las que la composición de lectina:proteína unida se lava antes de medir la unión a proteína para reducir las mediciones de fondo causadas por los polipéptidos sin unir. El lavado de la lectina después de la incubación de la composición de polipéptido y antes de la detección de la unión lectina:proteína se realiza en un tampón apropiado más detergente. Detergentes adecuados incluyen, pero no se limitan a óxidos de alquildimetilamina, alquil glucósidos, alquil maltósidos, sulfatos de alquilo (tales como dodecil sulfato sódico (SDS)), NP-40, alquil tioglucósidos, betainas, ácidos biliares, serie CHAP, digitonina, glucamidas, lecitinas/lisolecitinas, detergentes no iónicos basados en polioxietileno, incluyendo TRITON-X, polisorbatos, tales como TWEEN® 20 y TWEEN® 80, BRIJ®, GENAPOL® y THESIT®, compuestos de amonio cuaternario, y similares. Véase también *Current Protocols in Protein Science*, Apéndice 1B, Supl. 11, 1998, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. Los detergentes adecuados se pueden determinar usando experimentación de rutina (véase Neugebauer, J., *A Guide to the Properties and Use of Detergents in Biology and Biochemistry*, Calbiochem-Novabiochem Corp. La Jolla, Calif., 1988).

Como se ha analizado anteriormente, la proteína lectina se puede unir a un residuo detectable o una etiqueta detectable. Residuo o etiqueta detectable se refiere a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, o químicos. El residuo detectable a menudo genera una señal que se puede medir, tal como una señal radiactiva, cromogénica, o fluorescente, que se puede usar para cuantificar la cantidad de residuo detectable unido en una muestra. El residuo detectable se puede incorporar en o unir a la proteína, ya sea de forma covalente, o a través de enlaces iónicos, de van der Waals o de hidrogeno, por ejemplo, la incorporación de nucleótidos radiactivos, o nucleótidos biotinilados que son reconocidos por la estreptavidina. El residuo detectable se puede detectar directa o indirectamente. La detección indirecta puede implicar la unión de un segundo residuo detectable directa o indirectamente a la fracción detectable. Por ejemplo, el residuo detectable puede ser el ligando de una pareja de unión, tal como biotina, que es una pareja de unión para la estreptavidina. La pareja de unión puede ser detectable en sí misma, por ejemplo, un anticuerpo se puede etiquetar con una molécula fluorescente. La selección de un método de cuantificación de la señal se consigue, por ejemplo, con recuento de centelleo, densitometría, o citometría de flujo.

Ejemplos de etiquetas adecuadas para uso en los métodos de ensayo de la invención incluyen, marcadores radiactivos, fluoróforos, reactivos con densidad electrónica, enzimas (por ejemplo, como se usan normalmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos, así como proteínas que se pueden hacer detectables, por ejemplo, mediante la incorporación de una radioetiqueta en el hapteno o péptido, o se pueden usar para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el hapteno o péptido. También se contemplan proteínas para las que hay disponibilidad de antisueros o anticuerpos monoclonales, o moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana, una nanoetiqueta, una perla de masa molecular, un agente magnético, una nano- o microperla que contiene un tinte fluorescente, un punto cuántico, una perla cuántica, una proteína fluorescente, dendrímeros con una etiqueta fluorescente, un microtranspondedor, una molécula o estructura molecular dadora de electrones, o una partícula que refleja la luz.

Etiquetas adicionales contempladas para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares), radioetiquetas (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA), y etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal, perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.), y etiquetas luminiscentes o quimioluminiscentes (por ejemplo, Europio (Eu), MSD Sulfo-Etiqueta).

La etiqueta se puede acoplar directa o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En una realización específica, la etiqueta se une de forma covalente al componente usando un reactivo de éster de isocianato o N-hidroxisuccinimida para la conjugación de un agente activo de acuerdo con la invención. En un aspecto de la invención, los reactivos de isocianato bifuncionales se usan para conjugar una etiqueta a un biopolímero para formar un conjugado de etiqueta y biopolímero conjugado sin un agente activo unido al mismo. El conjugado de etiqueta y biopolímero se puede usar como un compuesto intermedio para la síntesis de un conjugado etiquetado de acuerdo con la invención o se puede usar para detectar el conjugado de biopolímero. Como se ha indicado anteriormente, se puede usar una gran diversidad de etiquetas, con la elección de la etiqueta dependiendo de la sensibilidad requerida, facilidad de conjugación con el componente deseado del

ensayo, requisitos de estabilidad, instrumentación disponible, disposiciones de eliminación. A menudo, las etiquetas no radiactivas se unen por medios indirectos. Por lo general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une de forma covalente a la molécula. A continuación, el ligando se une a otras moléculas (por ejemplo, molécula de estreptavidina), que se puede detectar de forma inherente o se puede unir de forma covalente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente.

Los compuestos útiles en el método de la invención también se pueden conjugar directamente a compuestos que generan señales, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Enzimas adecuadas para su uso como etiquetas incluyen, pero no se limitan a, hidrolasas, en particular fosfatasas, esterasas y glicosidasas, u oxidotasas, en particular peroxidasas. Compuestos fluorescentes adecuados para su uso como etiquetas incluyen, pero no se limitan a, los enumerados anteriormente, así como derivados de fluoresceína, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, eosina, TRITC-amina, quinina, fluoresceína W, amarillo de acridina, lisamina rodamina, cloruro de sulfonilo B eritrosceína, rutenio (tris, bipyridinio), europio, rojo Texas, dinucleótido de nicotinamida y adenina, dinucleótido de flavina y adenina, etc. Compuestos quimioluminiscentes adecuados para su uso como etiquetas incluyen, pero no se limitan a, MSD Sulfa-TAG, Europio (Eu), Samario (Sm), luciferina y 2,3-dihidroftalacindionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de los diversos sistemas de etiquetado o de producción de señales que se pueden usar en los métodos de la presente invención, véase el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.391.904.

Los expertos en la materia conocen bien medios para detectar etiquetas y son dictados por el tipo de etiqueta a detectar. Por lo tanto, por ejemplo, cuando la etiqueta es radiactiva, medios de detección incluyen un contador de centelleo (por ejemplo, radioinmunoensayo, ensayo de centelleo por proximidad) (Pitas *et al.*, Drug Metab Dispos. 34: 906-12, 2006) o película fotográfica, como en autorradiografía. Cuando la etiqueta es una etiqueta fluorescente, ésta se puede detectar mediante excitación del fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectando la fluorescencia resultante (por ejemplo, ELISA, citometría de flujo, u otros métodos conocidos en la técnica). La fluorescencia se puede detectar de forma visual, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De forma análoga, etiquetas enzimáticas se pueden detectar proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Etiquetas colorimétricas o quimioluminiscentes se pueden detectar simplemente observando el color asociado con la etiqueta. Otros sistemas de etiquetado y detección adecuados para su uso en los métodos de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia. Moduladores y ligandos etiquetados de este tipo se pueden usar en el diagnóstico de una enfermedad o estado de salud.

En otra realización, la muestra que contiene la proteína derivada de plasma se pone en contacto primero con un agente de unión (que no es una proteína lectina) que se une a la proteína de interés. El agente de unión puede ser un anticuerpo, un receptor soluble, un ligando, un cofactor, u otra proteína que se une a la proteína derivada de plasma o proteína recombinante con especificidad. Por "con especificidad" se entiende que el agente de unión se puede unir a una proteína con particularidad, pero no se une exclusivamente a una molécula o residuo diana. "Se une de forma específica" se refiere a la capacidad de un agente de unión para reconocer y unirse preferentemente a una proteína diana definida u otro residuo (por ejemplo, carbohidrato).

El método también comprende opcionalmente una etapa de bloqueo, en la que el agente de unión se pone en contacto con un agente de bloqueo antes de ponerse en contacto con la muestra para retirar cualquier residuo de azúcar no deseado del agente de unión a proteína usado para capturar o unirse a la proteína. Ejemplos de agentes de bloqueo, incluyen, pero no se limitan a, albúmina de suero, gelatina, soluciones de glicosidasa, que escinden residuos de azúcar en particular, agentes de modificación de hidratos de carbono, tales como agentes de acetilación o agentes de metilación que modifican los hidratos de carbono, una solución de oxidación de hidrato de carbono, tal como una solución de peryodato, y otros agentes de bloqueo conocidos en la técnica.

En una realización, la composición o agente de unión etiquetados útiles en los métodos de la invención se unen a un soporte sólido, que incluye, pero no se limita a, filtros, placas o membranas. Además se contempla que los compuestos y los agentes de unión etiquetados se pueden etiquetar e interactuar en solución. Por ejemplo, el anticuerpo de captura se puede etiquetar con una molécula dadora de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) y un segundo agente de unión, tal como una proteína lectina, se etiqueta con una molécula aceptora de FRET de modo que las moléculas están en proximidad cuando se produce la unión. Como alternativa, la proteína lectina se puede etiquetar con el dador de FRET y la molécula de proteína se puede etiquetar con el aceptor de FRET. Otra posibilidad es separar la molécula inactivación y fluorescente ambas presentes en el anticuerpo o diana cuando la diana y el anticuerpo se hibridan. Las moléculas solamente están lo suficientemente cerca como para que la etiqueta emita si están interactuando con el reactivo similar. Esto produce un sistema en el que la molécula solamente emite cuando interactúa con el reactivo (control directo). Se puede usar un filtro de paso de banda estrecha para bloquear todas las longitudes de onda excepto la de la etiqueta de la molécula. En la técnica pares de moléculas de FRET están disponibles en el mercado (por ejemplo, en Invitrogen), y se pueden usar de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las emisiones de FRET se detectan usando técnicas de formación de imágenes ópticas, tales como una cámara CCD.

Otro método para detectar interacciones de proteína derivada de plasma-lectina es etiquetar con un dador de

electrones. Esta etiqueta de dador aportaría electrones a un contacto eléctrico al que se une el reactivo. Véase, por ejemplo, Ghindilis, A. (Biochem Soc Trans. 28: 84-9, 2000) y Dai *et al.* (Cancer Detect Prev. 29: 233-40, 2005) que describen enzimas útiles en, y métodos para electro inmunoensayos. A continuación el contacto de electrones sería leído por un convertidor de A a D (analógico a digital) y cuantificado. Cuanto mayor sea el recuento de electrones, mayor es el número de interacciones que se producen.

Una realización de una etiqueta capaz de detectar una molécula individual es el uso de partículas de resonancia de plasmones (PRP) como indicadores ópticos, como se describe en Schultz *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 97: 996-1001 (2000), incorporado en el presente documento por referencia. Las PRP son nanopartículas metálicas, por lo general de 40-100 nm de diámetro, que dispersan la luz de forma elástica con una eficiencia notable debido a una resonancia colectiva de la conducción de electrones en el metal (es decir, la resonancia de plasmones superficiales). La magnitud, longitud de onda del pico y el ancho de banda espectral de la resonancia de plasmones asociada con una nanopartícula depende del tamaño, forma y composición del material de la partícula, así como del entorno local. Al modificar estos parámetros durante la preparación, se pueden formar PRP que tienen picos de dispersión en cualquier zona del intervalo visible del espectro. Para las PRP esféricas, tanto la longitud de onda de dispersión del pico como la eficacia de dispersión aumentan con radios mayores, proporcionando un medio para producir diferentes etiquetas coloreadas. Poblaciones de esferas de plata, por ejemplo, se pueden preparar de forma reproducible para las que la longitud de onda de dispersión del pico está dentro de unos pocos nanómetros de la longitud de onda diana, mediante el ajuste del radio final de las esferas durante su preparación. Dado que las PRP son brillantes, una vez que se dimensionan a tamaño de nanopartículas, éstas se usan como indicadores para la detección de una molécula individual; es decir, la presencia de una PRP unida en un campo visual puede indicar un único suceso de unión.

Los complejos de lectina:proteína derivadas de plasma también se pueden detectar usando técnicas derivadas de nanopartículas. Véase, por Ejemplo, Ao *et al.*, (Anal Chem. 78: 1104-6, 2006) que describe la inactivación de nanopartículas de oro, Chen *et al.*, (Biomaterials 27: 2313-21, 2006) que describe superficies de nanopartículas de SiO(2)/Au en detección de anticuerpos, y Lieu *et al.*, (J Immunol Methods. 307: 34-40, 2005), que describe nanopartículas de dióxido de silicio que contienen dibromofluoresceína para uso en inmunoensayo de fosforescencia a temperatura ambiente en sustrato sólido (SS-RTP-IA).

Para los métodos de la invención, el agente de unión o proteína derivada de plasma se puede unir a una diversidad de soportes sólidos, que incluyen, pero no se limitan a, filtros, membranas de PVC, membranas de PDVF, placas de PVC y otras placas que unen proteínas, microvehículos, macro perlas en fase sólida, perlas magnéticas, hechas por ejemplo, de poliestireno, nanopartículas, tales como nanopartículas bimetálicas de plata-oro (Yan Cui *et al.*, J. Phys. Chem. B, 110: 4002 -06, 2006), láminas de membrana de poliamida (PAM) (Sun *et al.*, Analytical Letters 34: 1627-37, 2001) y perlas de polisiloxano/alcohol polivinílico (Coelho *et al.*, Biotechnology Letters 24: 1705-1708, 2002).

Por ejemplo, las microesferas con múltiples rellenos moleculares fluorescentes, materiales diferentes, textura de la superficie, patrones de la superficie, etc. se pueden utilizar como etiquetas de identificación. Se contempla que o bien el anticuerpo de captura o la enzima lisosómica está unido de forma covalente a la perla y reacciona con respecto a la pareja de unión opuesta para someter a ensayo la cantidad de anticuerpo específico o enzima lisosómica en suero. Véase, por ejemplo Current Protocols in Immunology, Unidad 6.11). Las microesferas llenas con fluorescencia están disponibles en la actualidad en Molecular Probes, Inc. y otras compañías. En la actualidad están disponibles microesferas tales como perlas de poliestireno con un diámetro tan pequeño como 20 nm de diámetro.

La proteína derivada de plasma o el agente de unión se une al soporte sólido usando protocolos convencionales en la técnica, por ejemplo, tal como lo describe el fabricante del soporte, o usando técnicas de reticulación química convencionales conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, los kits de reticulación de Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

Kits

Los kits también se contemplan dentro del alcance de la invención. Un kit habitual puede comprender proteína lectina que se une de forma específica a una proteína derivada de plasma, tal como un factor de coagulación sanguínea, ligado opcionalmente a una etiqueta detectable, y un patrón de proteína que contiene una cantidad conocida de una proteína. En una realización, el kit comprende adicionalmente un agente de unión, que se une de forma específica a la proteína derivada de plasma, en el que el agente de unión es un anticuerpo, una proteína receptor soluble, un ligando, un cofactor (por ejemplo, un segundo factor de coagulación sanguínea o una chaperona) u otro agente que se une de forma específica a la proteína derivada de plasma. El kit puede incluir opcionalmente reactivos para realizar un inmunoensayo tal como un segundo agente de unión, unido a una etiqueta detectable que, o bien se une a una proteína derivada de plasma o a la proteína lectina; si la etiqueta es una enzima, el kit también puede incluir un sustrato desde el que la enzima libera una señal detectable. Además se contempla que el kit comprende un agente del bloqueo para evitar la unión no específica de la composición de lectina.

Aspectos y detalles adicionales de la invención serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que pretenden

ser ilustrativos más que limitantes.

Ejemplos

5 Ejemplo 1 Unión de aglutinina de *Sambucus Nigra* (SNA) de VWF de plasma y VWF derivado de células CHO recombinantes (rVWF)

Las proteínas humanas expresan patrones de glicosilación únicos en comparación con las proteínas producidas en otros organismos, lo que presenta una dificultad cuando se producen proteínas recombinantes en las que la glicosilación es importante en función de la proteína. Una de las líneas celulares más populares para la producción de proteína recombinante humana, las células de ovario de hámster chino (CHO), carece de la enzima α 2,6 sialiltransferasa, que confiere la adición de ácido α 2,6 siálico en glicoproteínas complejas. Mientras que esta diferencia puede influir de forma mínima con respecto a la interferencia con la actividad de una proteína, esta diferencia en la glicosilación se puede usar para distinguir proteína producida de forma recombinante o proteínas humanas secretadas producidas de forma natural. Las proteínas lectina que distinguen entre los diferentes patrones de glicosilación se pueden usar en ensayos de unión para determinar los niveles de proteína recombinante o de origen natural en una muestra biológica. Por ejemplo, la aglutinina de *Sambucus Nigra* (SNA) se une al ácido neuramínico unido en α 2,6 (ácido siálico) pero no al ácido α 2,3 neuramínico.

Para determinar si la unión a SNA podría distinguir las proteínas humanas de origen natural de la proteína producida de forma recombinante en células CHO, se usaron vWF derivado de plasma (pVWF) y vWF producidos de forma recombinante (rVWF) en un ensayo de unión a SNA.

Un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es un método para detectar el antígeno del factor de von Willebrand (vWF:Ag), que mide la cantidad de vWF, independiente de la función vWF, que por lo general constituye vWF formando un complejo con el factor VIII. Sin embargo, este ensayo no puede diferenciar entre proteína derivada de plasma o recombinante. Por lo tanto, una forma modificada de este ensayo se usa para detectar vWF glicosilado.

En resumen, para el ensayo de detección de glicosilación, por lo general, una preparación de anticuerpo anti- vWF humano policlonal o monoclonal se une a microplacas de poliestireno en condiciones ligeramente alcalinas. Después del bloqueo con una solución de proteína no glicosilada inerte, la incubación de las muestras con oxidación con peryodato reduce la capacidad del anticuerpo de revestimiento para unirse a SNA mediante la retirada de residuos de ácido siálico en la proteína del anticuerpo. Entonces se cargan en los pocillos varias diluciones de plasma humano o una preparación de rVWF. Después de una etapa de lavado retirando componentes de la muestra no unidos, se permite que VWF/rVWF unido a anticuerpo reaccione con SNA biotinilado. La lectina unida (SNA) se detecta a continuación por reacción con una preparación de estreptavidina-peroxidasa midiendo la actividad de la peroxidasa con un sustrato apropiado.

Las siguientes condiciones experimentales se usaron para medir cualquiera de vWF derivado de plasma o rVWF en ensayos separados: se incubaron 100 μ l de solución de revestimiento (anti-VWF humano, (Dako, Dinamarca), diluidos a 1/500 en tampón de revestimiento de Na_2CO_3 0,1 M, NaHCO_3 0,1 M, pH 9,5; como alternativa, también se puede usar cualquier anticuerpo monoclonal en una dilución apropiada) durante 16 horas a 4 °C o durante 1 h a 37 °C en pocillos de una microplaca MAXISORP™ F96 (NUNC, Alemania). Después de lavar en tampón de lavado (NaCl al 0,8 %, KCl al 0,02 %, KH_2PO_4 al 0,02 %, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ al 0,126 %, Tween 20 al 0,05 % [calidad para EIA, Bio-Rad, Hercules, CA], pH 7,0 - 7,4) los pocillos se bloquearon mediante incubación con tampón de dilución (gelatina al 0,1 % [Bio-Rad, EIA-grade] o albúmina de suero bovino al 0,1 % [SIGMA, calidad para EIA, St. Louis, MO], clorhidrato de benzamidina 2 mM en tampón de lavado) usando 200 μ l/pocillo durante 30 minutos a 37 °C. Después de lavar, la oxidación con peryodato se realizó mediante incubación de los pocillos con 200 μ l/pocillo de solución de peryodato (peryodato sódico 10 mM en acetato sódico 50 mM, pH 5,5) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). La placa lavada se incubó a continuación durante 5 minutos a TA con 200 μ l/pocillo de solución de etanolamina (etanolamina al 1 % en agua) y se lavó de nuevo.

La diluciones de la muestra se prepararon usando tampón de dilución. Para la combinación de plasma humano, se preparó una dilución en serie que comprendía las diluciones 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 y 1/6400 correspondientes a concentraciones de VWF:Ag que variaban de 2,88 a 0,18 mU de VWF:Ag/ml. Para las muestras que contenían rVWF, la preparación de rVWF se usó a concentraciones más elevadas (311-19 mU/ml). Se cargaron 100 μ l/pocillo por duplicado en los pocillos y se incubaron durante 60 minutos a TA. A continuación, la placa se lavó y se añadieron 100 μ l/pocillo de SNA biotinilada (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a una concentración de 2 μ g/ml. Las placas se incubaron durante 60 minutos a TA y se lavaron y se añadieron 100 μ l/pocillo de estreptavidina-peroxidasa (Dako, diluido a 1/4000) y se incubó durante 30 minutos a TA. La incubación terminó con una etapa de lavado. La peroxidasa unida se detectó con una reacción de color con el sustrato de peroxidasa SUREBLUE™ (KPL, Gaithersburg, MD). Se incubaron 100 μ l/pocillo de muestra de 10 a 15 minutos a TA. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μ l/pocillo de H_2SO_4 1,5 M. Posteriormente, la placa se midió con un lector de ELISA a 450 nm con la longitud de onda de referencia establecida en 620 nm. Para evaluación de datos adicional, se realizó un análisis de regresión lineal usando los valores medios corregidos con el blanco de las densidades ópticas medidas y las concentraciones de VWF:Ag de las diluciones de la combinación de plasma. La curva de calibración

obtenida se usa para calcular la unión a SNA de los valores desconocidos con respecto a los obtenidos para la combinación de plasma, que se estableció en un 100 %.

El análisis de VWF de plasma dio como resultado una clara relación dependiente de la dosis entre la concentración de VWF:Ag y la unión a SNA medida. Esta relación era altamente lineal ($R^2 = 0,9996$) dentro del intervalo definido de 0,2 a 2,9 mU de VWF:Ag/ml lo que permite la construcción de una curva de calibración lineal. Al contrario que el VWF de plasma, el rVWF derivado de células CHO no mostraba unión a SNA incluso cuando se usaban concentraciones 100 veces más elevadas. Por lo tanto, las preparaciones se pueden diferenciar por su diferente reactividad con SNA. Se obtuvieron resultados similares usando un VWF anti-humano monoclonal con un epítipo de unión definido en el dominio A1 del VWF humano. Estas diferencias de reactividad hacia SNA reflejan el hecho de que el rVWF derivado de células CHO no contiene ácido neuramínico unido en $\alpha 2,6$, que es la estructura de glicano requerida de forma específica para la unión a SNA.

Ejemplo 2: Unión a SNA del factor IX (pFIX) de plasma y factor IX derivado de células CHO recombinantes (rFIX)

Para determinar si la reactividad del VWF:Ag derivado de plasma con SNA es única para el VWF de plasma, se analizó un segundo factor de coagulación sanguínea derivado de CHO, Factor IX (FIX), en un ensayo de unión a SNA.

Una preparación de anticuerpo anti-FIX humano policlonal se unió a microplacas de poliestireno como se hizo anteriormente. Para la combinación de plasma humano, una serie de dilución geométrica se preparó en tampón de dilución usando las diluciones 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 y 1/5120 correspondientes a concentraciones de FIX:Ag que varían de 3,09 a 0,19 mU de FIX:Ag/ml. La preparación de rFIX se investigó a concentraciones más elevadas (78 – 4,9 mU/ml). Se cargaron 100 μ l/pocillo a los pocillos por duplicado y se incubaron durante 60 minutos a TA, y el desarrollo se realizó como se describió anteriormente.

De un modo similar al de los resultados con la proteína de VWF de plasma, se produjo una clara relación dependiente de la dosis entre la concentración de FIX:Ag en plasma y la unión a SNA medida. Esta relación era lineal ($R^2 = 0,9963$) dentro del intervalo definido de 0,2 a 3,1 mU de FIX:Ag/ml que permite la construcción de una curva de calibración. Al contrario que el FIX de plasma, el rFIX derivado de células CHO no mostró unión a SNA incluso a las concentraciones 10 veces superiores investigadas. Por lo tanto, ambas preparaciones se pueden diferenciar por su diferente reactividad con SNA.

Ejemplo 3: Medida de unión a SNA de VWF de plasma y rVWF derivado de células CHO después de tratamiento con neuraminidasa

Para asegurar que la unión a SNA era específica para SNA, la especificidad de la unión a SNA se investigó usando la enzima neuraminidasa, que retira por escisión o desialila ambos el ácido $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ neuramínico de oligosacáridos. Después de incubación de VWF de plasma y rVWF unidos a anticuerpo con niveles crecientes de neuraminidasa en la placa de microtitulación, se midieron los efectos de la desialilación de neuraminidasa en la unión a SNA de pVWF y rVWF.

Las placas de microtitulación anti-VWF se prepararon para análisis, tal y como se ha descrito anteriormente. Tanto la combinación de plasma humano como la preparación de rVWF se diluyeron para obtener concentraciones de VWF:Ag de 5 mU/ml y 2,5 mU/ml. Se cargaron 100 μ l/pocillo de estas diluciones a las placas oxidadas con peryodato y revestidas y se incubó durante 60 minutos a TA y se lavaron a continuación. A continuación, se realizó la digestión de neuraminidasa en la placa con el VWF derivado de plasma y rVWF inmovilizados por el anticuerpo unido. La neuraminidasa (Sigma, St. Louis, MO) se usó a las concentraciones de 0,1, 5, 10 y 20 mU/ml, obtenidas por dilución de la enzima con Bis-Tris-Propano 20 mM que contenía 2 mg/ml de albúmina de suero bovino. Se incubaron 100 μ l/pocillo de solución de neuraminidasa durante 2 horas a 37 °C. A continuación, las placas se lavaron y se incubaron con SNA biotinilada (Vector; 2 μ g/ml; 100 μ l/pocillo) durante 60 minutos a TA. Esta incubación terminó mediante lavado antes de que las placas se incubaran 30 minutos a TA con estreptavidina peroxidasa (Dako, 1/4000). Después de una etapa de lavado final, la actividad de peroxidasa unida se midió con el sustrato de peroxidasa SUREBLUE™ como se ha mencionado anteriormente.

Los resultados muestran que, mientras que el VWF derivado de células CHO no muestra unión a SNA en el ensayo de SNA, esta unión no se ve alterada después del tratamiento con neuraminidasa, sin embargo, la unión a SNA del VWF de plasma se reduce de manera proporcional a la concentración de la neuraminidasa aplicada. Este resultado se observó con ambas concentraciones de VWF:Ag investigadas. A una concentración de neuraminidasa de 20 mU/ml y con las condiciones experimentales aplicadas, la unión a SNA es inferior a un 95 % de la concentración medida inicialmente.

Estos resultados muestran que la proteína de SNA se une de forma específica al ácido $\alpha 2,6$ N-acetilneuramínico, dado que la retirada del ácido neuramínico de la proteína derivada de plasma provocaba una pérdida de unión. El rVWF derivado de células CHO no muestra unión a SNA con y sin tratamiento con neuraminidasa porque el ácido

neuramínico está presente solamente en una unión que no es reconocida por SNA ni hidrolizada con neuraminidasa.

Ejemplo 4: Medida de la unión de VWF de plasma y rVWF derivado de células CHO después de tratamiento con neuraminidasa a la lectina aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA)

Dado que rVWF no se unía SNA debido a la falta de ácido neuramínico unido en $\alpha 2,6$, no se esperaba que la retirada del ácido neuramínico alterara la unión de SNA con respecto rVWF. Para confirmar que la proteína recombinante expresaba residuos de ácido siálico, pero en una configuración diferente que el ácido siálico derivado de plasma, se usó un ensayo de unión que mide la unión de la proteína al ácido neuramínico unido en $\alpha 2,3$ para detectar el ácido neuramínico unido en $\alpha 2,3$ expresado de forma recombinante en la proteína recombinante. La lectina, aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA), que se une al ácido neuramínico unido en $\alpha 2,3$, se usó para determinar si la desialilación de rVWF se producía en presencia de neuraminidasa. Después de incubar VWF de plasma y rVWF unido a anticuerpo con niveles crecientes de neuraminidasa, se midió la unión de las proteínas a MAA.

Las placas de anti-vWF se prepararon como se ha hecho anteriormente. Tanto la combinación de plasma humano como la preparación de rVWF se diluyeron para obtener concentraciones de VWF:Ag de 5 mU/ml y 2.5 mU/ml. Se cargaron 100 μ l/pocillo de las diluciones de la muestra a las placas oxidadas con peryodato, revestidas y se incubó durante 60 minutos a TA y se lavó a continuación. La digestión con neuraminidasa se realizó a continuación en la placa. La neuraminidasa (Sigma) se usó a las concentraciones de 0,1, 5, 10 y 20 mU/ml. A continuación, las placas se lavaron y se incubaron con la MAA biotinilada (Vector, 1 μ g/ml) durante 60 minutos a TA. La incubación terminó mediante lavado, tras lo que las placas se incubaron 30 minutos a TA con estreptavidina peroxidasa (DakoCytomation, 1/4000). Después de una etapa de lavado final, la peroxidasa unida se midió como se ha descrito anteriormente.

El vWF recombinante se unió mediante la lectina de MAA lo que indica la presencia de ácido siálico en la proteína recombinante. La adición de neuraminidasa a los pocillos de cultivo anuló la unión tanto de VWF de plasma como de rVWF a MAL, que reconoce el ácido neuramínico cuando está presente en una unión en $\alpha 2,3$. Incluso la concentración más baja de enzima sometida a ensayo mostraba una reducción >95 % de la unión a MAL. Se obtuvieron datos similares cuando se usaba VWF a una concentración de 2,5 mU/ml. Por lo tanto, la desialilación eficaz también se produjo para la preparación de rVWF solamente detectable cuando se usa MAL, pero indetectable cuando se aplica SNA lo que indica la especificidad de la unión de SNA a VWF de plasma y no a VWF recombinante.

Ejemplo 5: Inhibición de la unión de SNA a VWF de plasma y VWF recombinante derivado de células CHO (rVWF) con 6'-sialillactosa

Las lectinas se unen de forma específica a monosacáridos u oligosacáridos, que pueden estar ya sea libres en solución o como parte de oligosacáridos de mayor tamaño encontrados en glicoproteínas, glicolípidos u otros glicoconjugados. La especificidad de la unión a lectina se puede investigar mediante estudios de inhibición usando estos mono- u oligosacáridos en ensayos de unión de competición. Se sabe que el trisacárido 6'-sialillactosa es un potente inhibidor de la unión de la lectina SNA y se usó para confirmar la especificidad de la unión de SNA a VWF de plasma.

Las placas con anti-vWF se revistieron y se prepararon como anteriormente. Las muestras de combinación de plasma humano se diluyeron para obtener una concentración de VWF:Ag de 5 mU/ml. Se cargaron 100 μ l/pocillo y se incubaron durante 60 minutos a TA. Se añadieron 50 μ l de 6-sialillactosa (Sigma, A-9204) a la placa a concentraciones que variaban de 2,1 a 150 μ M y a continuación se añadieron 50 μ l de la SNA biotinilada (Vector, 1 μ g/ml) y se incubó durante 60 minutos a TA. La incubación terminó mediante lavado, tras lo que las placas se incubaron 30 minutos a TA con estreptavidina peroxidasa (DakoCytomation, 1/4000). Después de una etapa de lavado final, la peroxidasa unida se midió como se ha descrito anteriormente.

El trisacárido 6'-sialillactosa presenta una inhibición dependiente de la concentración de la unión de SNA a VWF de plasma en las condiciones experimentales usadas, lo que demuestra una inhibición de aproximadamente un 25 % a 10 μ M de 6'-sialillactosa y una inhibición de un 75 % a 100 μ M de 6'-sialillactosa. Esta observación confirmaba que la unión medida era dependiente de las estructuras de N-glicano de VWF de plasma y no estaba causada por ninguna otra reacción.

Ejemplo 6: Inhibición de la unión de SNA a VWF de plasma y VWF recombinante derivado de células CHO (rVWF) con 3'-sialillactosa

Sería de esperar que otro trisacárido, 3'-sialillactosa, en el que el ácido neuramínico está unido en $\alpha 2,3$ al residuo de galactosa de la lactosa, no mostrara efectos en la unión de SNA a VWF de plasma ya que el VWF de plasma carece de ácido $\alpha 2,3$ siálico. Para examinar la especificidad de unión, se midieron los efectos de la 3'-sialillactosa en proteína derivada de plasma y proteína recombinante derivada de células CHO.

Las placas específicas de VWF-Ag se prepararon como se ha mostrado anteriormente y el ensayo de inhibición de 3'-sialilactosa se realizó como se ha descrito para el ensayo de 6' sialilactosa en el Ejemplo 5 mencionado anteriormente. Los resultados demostraban que la 3'-sialilactosa no tenía efecto en la unión de SNA a VWF de plasma, lo que confirma que la SNA se une al ácido neuramínico solamente cuando está presente en una unión en $\alpha 2,6$.

Ejemplo 7: Curva de calibración de 4 puntos para la medición de VWF recombinante derivado de células CHO (rVWF) en presencia de VWF de plasma

Para determinar si el ensayo de unión a SNA podría permitir la cuantificación de la cantidad de proteína derivada de plasma en comparación con la proteína recombinante en una muestra individual, las muestras de ensayo que comprenden tanto el VWF de plasma como el VWF recombinante se analizaron para la unión a SNA y se desarrolló una curva de calibración para cuantificación de rVWF en las muestras.

En resumen, una combinación de plasma normal humano que contenía VWF:Ag a una concentración de aproximadamente 1 U/ml se añadió con 0, 0,2, 0,5, 1,0 y 2,0 U de rVWF. La concentración de VWF:Ag y la unión a SNA de estas muestras se midió en seis unidades de ensayo independientes. La unión a SNA medida para una combinación de plasma humano sin adiciones, separada se usó como base para calcular una unión a SNA hipotética, esperada para las muestras con adiciones bajo la suposición de que el VWF:Ag presente en estas muestras fuera solamente VWF de plasma. Se calculó la diferencia entre estos valores de unión a SNA calculados de forma hipotética y los valores medidos, lo que refleja las cantidades de rVWF en mezcla con el VWF de plasma. Para verificar esta suposición, las diferencias en la unión se representaron a continuación con respecto a la cantidad de rVWF contenido en estas muestras y se realizó un análisis de regresión lineal. Por lo tanto, se obtuvo una curva de calibración que permite la determinación de las concentraciones de rVWF en presencia de VWF de plasma.

Las placas de microtitulación de anti-VWF se prepararon como se mencionó anteriormente. Para la curva de calibración, se preparó una serie de muestras de dilución que comprende las diluciones 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600 usando una combinación de plasma humano. Las muestras se diluyeron para obtener concentraciones de VWF:Ag dentro del intervalo cubierto por esta curva de calibración. Se cargaron 100 μ l/pocillo de estas diluciones, se incubó durante 15 minutos a TA antes de añadir 100 μ l/pocillo del anticuerpo de detección (anti-VWF humano - peroxidasa de conejo, Dako, 1/2000). Esta incubación se realizó durante 60 minutos a TA y terminó con lavado. La actividad de la peroxidasa unida se midió con sustrato de peroxidasa SUREBLUE™. La reacción de color se detuvo usando ácido sulfúrico 1,5 M. Las placas se midieron posteriormente con un lector de ELISA a 450 nm con la longitud de onda de referencia establecida en 650 nm. La concentración de VWF:Ag de estas muestras se obtuvo a continuación en U/ml después de extrapolación en la curva de calibración.

La unión a SNA de las muestras se midió usando placas con anti-VWF preparadas como se ha mencionado anteriormente. Las diluciones de la muestra se prepararon usando tampón de dilución. Para la curva de calibración, se preparó una serie de diluciones que comprendía las diluciones 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 y 1/6400 usando una combinación de plasma humano. Las muestras se diluyeron para obtener la unión a SNA dentro del intervalo de concentración cubierto por esta curva de calibración. Se cargaron 100 μ l/pocillo de cada dilución a las placas oxidadas con peryodato, revestidas y se incubaron durante 60 minutos a TA. A continuación, las placas se lavaron y se incubaron con SNA biotinilada, y la unión a SNA se midió como se ha descrito anteriormente.

La Tabla 1 muestra datos obtenidos en las seis unidades de ensayo independientes para la concentración de VWF:Ag y la unión a SNA de estas muestras.

Tabla 1: unión a VWF:Ag y SNA de muestras con adiciones

	rVWF derivado de células CHO añadido a plasma humano				
VWF:Ag	0 U	0,2 U	0,5 U	1,0 U	2,0 U
Ensayo 1	0,93	1,11	1,49	2,07	3,18
Ensayo 2	0,94	1,11	1,47	1,95	3,21
Ensayo 3	0,91	0,99	1,26	1,93	2,98
Ensayo 4	0,92	1,06	1,32	1,99	3,14
Ensayo 5	0,88	1,05	1,29	1,92	3,06
Ensayo 6	0,91	1,08	1,30	1,56	3,50
Media	0,92	1,07	1,36	1,90	3,18
DT	2,3	4,2	7,3	9,3	5,6

	rVWF derivado de células CHO añadido a plasma humano				
	rVWF derivado de células CHO añadido a plasma				
unión a SNA	0 U	0,2 U	0,5 U	1,0 U	2,0 U
Ensayo 1	130,1	99,0	81,1	52,4	34,5
Ensayo 2	125,3	105,2	76,6	56,7	33,1
Ensayo 3	135,0	119,8	104,3	62,5	37,2
Ensayo 4	135,4	111,1	87,0	63,0	38,3
Ensayo 5	152,0	98,1	87,9	54,2	33,0
Ensayo 6	145,3	107,6	91,7	73,4	34,0
Media	137,2	106,8	88,1	60,4	35,0
DT	7,2	7,6	10,9	12,8	6,3

La unión a SNA de las muestras se obtuvo después de extrapolación a partir de una curva de calibración de unión a SNA:proteína y los niveles se expresan con respecto a los de la combinación de plasma humano que no se añadieron con proteína recombinante, se definió como un 100 % de unión a SNA. El VWF de plasma a una concentración media de 0,92 U presentaba una unión a SNA media correspondiente a un 137,2 % de la medida para una combinación de plasma humano. Usando esta unión a SNA media, tal como se mide para la muestra de plasma humano que no contiene rVWF, la unión a SNA hipotética se calculó para las muestras añadidas bajo la suposición de que la relación de VWF:Ag medida era solamente VWF de plasma. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Cálculo de la unión a SNA hipotética para las muestras de plasma añadidas con rVWF

	rVWF derivado de células CHO añadido a plasma humano				
	0	0,2	0,5	1,0	2,0
VWF Total	0,92	1,07	1,36	1,90	3,18
rVWF	-	0,15	0,44	0,99	2,26
Unión a SNA esperada	137,2	159,9	203,2	285,4	476,6
Unión a SNA encontrada	137,2	106,8	88,1	60,4	35,0
Diferencia	0,0	53,1	115,1	225,0	441,6
DT		4,0	12,5	28,7	28,0

La diferencia entre la unión calculada y la unión a SNA esperada se correlaciona bien con las concentraciones de rVWF derivado de células CHO añadidas a las muestras de plasma humano dentro del intervalo investigado en este experimento. Una buena relación lineal se observó cuando se añadían de 0,2 a 2,0 U de rVWF a una muestra que ya contenía 1 U de VWF:Ag, en la que concentraciones crecientes de vWF recombinante en la muestra daban como resultado diferencias mayores en la unión esperada. Una representación de la curva de calibración que correlaciona la diferencia en la unión a SNA con la cantidad de proteína recombinante se muestra en la Figura 1. Estos resultados muestran que el ensayo proporciona un método fiable para diferenciar entre proteína derivada de plasma y recombinante en una muestra y para determinar los niveles de cada tipo de proteína en una sola muestra.

Ejemplo 8: Curva de calibración de 8 puntos para la medida de VWF recombinante derivado de células CHO (rVWF) en presencia de VWF de plasma

Un ensayo cuantitativo adicional se desarrolló para el aumento de la sensibilidad en la medida de la cantidad de proteína derivada de plasma y proteína recombinante en una muestra.

Una combinación de plasma normal humano que contenía VWF:Ag a una concentración de aproximadamente 1 U/ml se añadió con 0, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 y 1,5 U de rVWF. La concentración de VWF:Ag y la unión a SNA de estas muestras se midió en seis unidades de ensayo independientes. La unión a SNA medida para la combinación de plasma humano sin adiciones se usó como base para calcular una unión a SNA hipotética, esperada, para las muestras con adiciones al igual que en el Ejemplo 7.

Las placas específicas para VWF se prepararon como se mencionó anteriormente. Para la curva de calibración, se preparó una serie de dilución que comprendía las diluciones 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600 usando una combinación de plasma humano, y la concentración de VWF:Ag y la unión de SNA se midió al igual que en el

Ejemplo 7. La unión a SNA de las muestras se obtuvo después de extrapolación en la curva de calibración y los niveles se expresan con respecto a los de la combinación de plasma humano, definidos como un 100 % de unión a SNA. La Tabla 3 muestra los datos de medida obtenidos en las seis unidades de ensayo independientes para la concentración de VWF:Ag y la unión a SNA de estas muestras.

5

Tabla 3: Unión a VWF:Ag y SNA de muestras añadidas

rVWF derivado de células CHO añadido a plasma humano									
VWF:Ag	0	0,2 U	0,4 U	0,5 U	0,6 U	0,8 U	1,0 U	1,2 U	1,5
Ensayo 1	0,85	1,10	1,27	1,35	1,39	1,70	1,90	2,00	2,20
Ensayo 2	1,09	1,10	1,24	1,32	1,47	1,94	2,24	-	-
Ensayo 3	0,95	1,06	1,22	1,34	1,39	1,80	1,89	2,06	2,15
Ensayo 4	0,95	1,09	1,20	1,38	1,43	1,62	1,89	2,00	2,07
Ensayo 5	0,95	1,13	1,22	1,42	1,49	1,68	1,85	1,95	2,09
Ensayo 6	0,96	1,16	1,40	1,38	1,48	1,62	1,81	2,04	2,13
Media	0,96	1,11	1,26	1,37	1,44	1,73	1,93	2,01	2,13
DTR	8,0	3,1	5,8	2,6	3,1	7,2	8,1	2,1	2,4
rVWF derivado de células CHO añadido a plasma humano									
SNA	0	0,2 U	0,4 U	0,5 U	0,6 U	0,8 U	1,0 U	1,2 U	1,5
Ensayo 1	134,6	94,3	80,2	76,4	71,5	62,9	60,8	55,0	56,3
Ensayo 2	110,0	90,0	81,6	73,7	74,8	n.d.	n.d.	43,0	42,6
Ensayo 3	135,1	92,7	85,7	77,5	73,4	59,8	55,6	56,4	56,0
Ensayo 4	117,1	90,3	87,8	85,2	76,7	58,8	n.d.	56,0	50,6
Ensayo 5	113,8	90,7	82,0	76,1	71,9	60,6	53,1	50,6	46,6
Ensayo 6	130,6	96,0	83,4	85,0	91,1	70,8	67,6	54,5	53,2
Media	123,5	92,3	83,5	78,9	76,6	62,6	59,3	52,6	50,9
DTR	9,1	2,6	3,4	6,2	9,6	7,7	10,8	9,8	10,7

El VWF de plasma a una concentración de 0,96 U tenía una unión a SNA media correspondiente a un 123,5 % de la medida para una combinación de plasma de referencia. Usando esta unión a SNA media medida para la muestra de plasma humano que no contenía rVWF derivado de células CHO, la unión a SNA hipotética se calculó para las muestras con adiciones bajo la suposición de que la relación VWF:Ag medida era solamente VWF de plasma. Estos datos se muestran en la Tabla 4.

10

Tabla 4: Cálculo de la unión a SNA hipotética para las muestras de plasma añadidas con rVWF derivado de células CHO

rVWF derivado de células CHO añadido a plasma humano									
	0	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1	1,2	1,5
VWF Total	0,96	1,11	1,26	1,37	1,44	1,73	1,93	2,01	2,13
rVWF		0,15	0,30	0,41	0,48	0,77	0,97	1,05	1,17
unión a SNA esperada	123,5	142,6	162,2	175,9	185,8	222,5	248,7	259,0	274,2
unión a SNA encontrada	123,5	92,3	83,5	79,0	76,6	62,6	59,3	52,6	50,9
Diferencia	0,0	50,3	78,7	96,9	109,2	159,9	189,4	206,4	223,4
DT	n.d.	1,3	2,7	6,0	10,5	12,4	20,5	20,1	23,9

Al igual que en el ensayo de calibración de 4 puntos descrito anteriormente, la diferencia con respecto a la unión a SNA esperada se correlaciona bien con las concentraciones de rVWF derivado de células CHO añadidas a las muestras de plasma humano incluso cuando se investigaban 8 concentraciones en un intervalo de adiciones más estrecho. Una representación de la curva de calibración de 8 puntos que correlaciona la diferencia en la unión a SNA

20

con la cantidad de proteína recombinante se muestra en la Figura 2.

5 Estos resultados muestran que la cantidad de proteína recombinante en una muestra de plasma humano se puede diferenciar fácilmente de proteína producida de forma natural en la muestra, basándose en la expresión diferencial de residuos de hidrato de carbono. Este tipo de ensayo es útil en el entorno clínico para determinar la cantidad de proteína exógena/terapéutica que se está administrando y su penetración en la corriente sanguínea en comparación con la cantidad de proteína producida de forma natural. Este ensayo también es útil para comparar la eficacia de un agente terapéutico con respecto a otro comparando la semivida en suero *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cuantificar la cantidad de proteína derivada de plasma (pdP) y proteína recombinante (rP) en una muestra, en el que la proteína derivada de plasma y la proteína recombinante son la misma proteína con diferentes patrones de glicosilación, dando lugar dichos diferentes patrones de glicosilación a diferentes grados de unión a lectina para la proteína derivada de plasma en comparación con la proteína recombinante, en el que la proteína total (tP) en dicha muestra se determina previamente y es igual a la cantidad de proteína derivada de plasma y proteína recombinante (pdP + rP), comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) calcular una diferencia entre la unión a lectina para dicha muestra y la unión a lectina esperada para una muestra hipotética de volumen igual que tiene una cantidad de proteína igual a tP, en la que la unión a lectina esperada se determina a partir de una curva patrón de unión a lectina frente a cantidades crecientes de proteína recombinante, y
 - (b) representar la diferencia de (a) en una curva de calibración para determinar la cantidad de proteína recombinante (rP) en dicha muestra, en la que la curva de calibración es una representación de la diferencia entre la unión a lectina esperada, calculada al igual que en (a), y la unión a lectina observada para mezclas que contienen cantidades conocidas de pdP y rP, como una función de cantidades crecientes de proteína recombinante (rP) en dichas mezclas, teniendo cada una de dichas mezclas una cantidad constante de pdP.
2. El método de la reivindicación 1 en el que la etapa de cálculo comprende poner en contacto la muestra con una composición de lectina y detectar la unión de proteína a la composición de lectina,
 - o en el que la lectina está etiquetada con una etiqueta detectable, siendo la etiqueta opcionalmente biotina,
 - o en el que la lectina es aglutinina de *Sambucus Nigra* (SNA),
 - o en el que la muestra es suero,
 - o en el que la proteína es un factor de coagulación sanguínea,
 - y en el que el factor de coagulación sanguínea se selecciona entre el grupo que consiste en factor de von Willebrand (vWF), Factor VIII (FVIII), Factor VII (FVII), y Factor IX (FIX),
 - o en el que la proteína recombinante está producida por células de ovario de hámster chino (CHO),
 - o en el que la proteína recombinante está producida en células de insecto,
 - o en el que la proteína derivada de plasma comprende ácido α 2,6-neuramínico y la proteína recombinante carece de ácido α 2,6-neuramínico.
3. El método de la reivindicación 1 en el que la mezcla se pone en contacto con un agente de unión específico para la proteína antes de ponerla en contacto con la composición de lectina.
4. El método de la reivindicación 3 en el que el agente de unión a proteína está unido en un soporte sólido.
5. El método de la reivindicación 3 en el que el agente de unión a proteína está en solución.
6. El método de la reivindicación 3 en el que el agente de unión a proteína es un anticuerpo.
7. El método de la reivindicación 6 en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
8. El método de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente, después de contacto con el agente de unión, poner en contacto la muestra con una solución de peryodato,
 - o en el que la proteína recombinante es un fragmento, variante o análogo de la proteína derivada de plasma.
9. Un método para diferenciar en una muestra proteína derivada de plasma y proteína recombinante, que comprende,
 - poner en contacto la muestra con una composición que comprende una proteína lectina;
 - detectar la unión de la lectina a la proteína; y
 - comparar la cantidad de unión de lectina unida a proteína en la muestra con una curva de unión de lectina:proteína para determinar la cantidad de proteína derivada de plasma en la muestra.
10. El método de la reivindicación 8 en el que la lectina es aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA).

11. Un kit para cuantificar en una muestra los niveles de proteína derivada de plasma y proteína recombinante, en el que la proteína derivada de plasma y la proteína recombinante codifican la misma proteína con diferentes patrones de glicosilación, comprendiendo el kit
- 5 un agente de unión a proteína;
- una composición que comprende una lectina específica para un carbohidrato en la proteína derivada de plasma y no para la proteína recombinante y una etiqueta detectable; y
- un patrón de proteína que comprende una proteína derivada de plasma que está unida por la composición de lectina, en el que el patrón se usa para hacer una curva de calibración.
- 10 12. El kit de la reivindicación 11 en el que el agente de unión es un anticuerpo, siendo el anticuerpo opcionalmente un anticuerpo monoclonal,
- o
- en el que la lectina es aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA),
- o
- 15 en el que la etiqueta detectable es biotina,
- o
- que comprende opcionalmente un reactivo de bloqueo.
- 20 13. El kit de la reivindicación 12 en el que el agente de bloqueo es una solución de peryodato.
14. El kit de la reivindicación 11 en el que la proteína es un factor de coagulación sanguínea.
15. El kit de la reivindicación 14 en el que el factor de coagulación sanguínea se selecciona entre el grupo que consiste en factor de von Willebrand, Factor VIII, Factor VII y Factor IX.
- 25

FIGURA 1

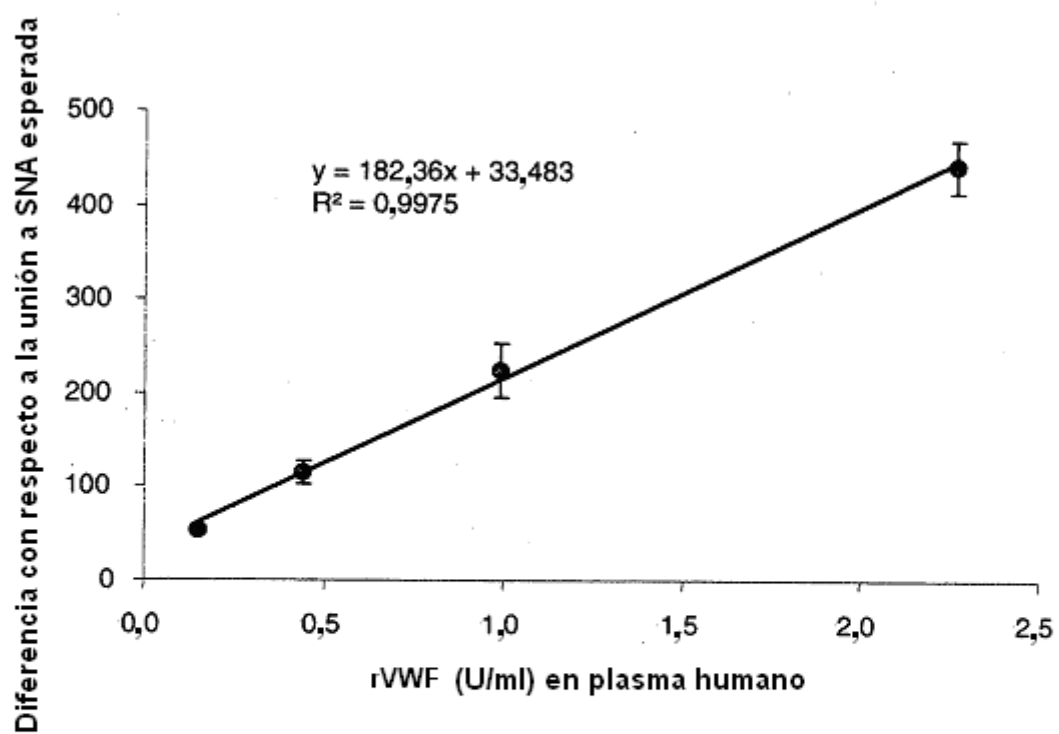


FIGURA 2

