

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 669**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2011 PCT/EP2011/052282**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO2011101370**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2011 E 11704217 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2537035**

54 Título: **Método para la determinación de variantes de secuencia de polipéptidos**

30 Prioridad:

18.02.2010 EP 10001645

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

21.04.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KOLL, HANS;
REGULA, JOERG THOMAS;
WIEGESHOFF, FRANK y
ZECK, ANNE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 609 669 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

Método para la determinación de variantes de secuencia de polipéptidos

5 En el presente documento se expone un método para la determinación de variantes de secuencia de un polipéptido que comprende una digestión triptica del polipéptido, una separación cromatográfica de los fragmentos, espectrometría de masas de alta resolución de los fragmentos separados y la determinación de variantes de secuencia.

10 Antecedentes de la invención

Las proteínas desempeñan un papel importante en la cartera médica de hoy en día. Para la aplicación en seres humanos, cada proteína terapéutica tiene que cumplir con criterios distintos. Para garantizar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos en seres humanos, las características de la proteína terapéutica tienen que caer dentro de ciertos límites y los subproductos que se acumulan durante el proceso de producción tienen que eliminarse concretamente.

15 Cualquier cambio o modificación de la composición y la secuencia de aminoácidos, respectivamente, de un polipéptido, que difiere de la forma deseada, se definen como una variante de secuencia. Esta puede ser una mutación en los ácidos nucleicos resultante de un cambio de la secuencia de aminoácidos, modificaciones no deseadas post-traduccionales (MPTs) o variantes de polipéptidos aberrantes (formas acortadas o alargadas).

20 Para garantizar la consistencia del polipéptido y evitar errores, tienen que ser objeto de evaluación la influencia de los mecanismos biológicos (por ejemplo, fidelidad de replicación, precisión de la transcripción y traducción) y los procesos técnicos (transfección y amplificación en el desarrollo de la estirpe celular o condiciones fermentativas) en presencia de variantes de secuencia. Asimismo tiene que proporcionarse un método que proporciona una alta sensibilidad para hallar e identificar posibles variantes de secuencia.

25 Por ejemplo, los procesos de desarrollo de estirpes celulares pueden dar lugar a variantes de secuencia que pueden volverse críticas para los interruptores de la estirpe celular y los cambios de clones, respectivamente. La fermentación en una escasez inesperada de ciertos componentes de medios en los sustratos alimenticios y las operaciones posteriores de transformación (OPT) pueden causar variantes de secuencia o la modificación post-traduccionales de aminoácidos, respectivamente. Por lo tanto, la presencia de variantes de secuencia tiene que comprobarse para confirmar la homogeneidad y la consistencia del producto.

30 Barnes, C.A.S., *et al.*, *Mass. Spectrom. Rev.* 26 (2007) 370-388 exponen aplicaciones de espectrometría de masas para la caracterización estructural de los productos farmacéuticos proteicos recombinantes. La espectrometría de masas para la caracterización estructural de anticuerpos terapéuticos es descrita por Zhang, Z., *et al.*, en *Mass. Spectrom. Rev.* 28 (2009) 147-176. Yu, X. C., *et al.* (*Anal. Chem.* 81 (2009) 9282-9290) describen la identificación de traducciones erróneas de serina a asparagina específicas de codón en los anticuerpos monoclonales recombinantes por espectrometría de masas de alta resolución. La determinación de la oxidación proteica por espectrometría de masas y la transferencia de métodos para el control de calidad son descritas por Houde, D., *et al.*, *J. Chromatogr.* 1123 (2006) 189-198.

35 Sumario de la invención

En el presente documento se proporciona un método para la determinación de variantes de secuencia de aminoácidos, es decir, las mutaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Indirectamente, con ello, también pueden determinarse variantes de secuencia de ácidos nucleicos.

40 Con más detalle, en el presente documento, se describe un método para determinar mutaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (producido), que comprende las siguientes etapas:

45 a) proporción de una muestra de un polipéptido (producido), b) incubación del polipéptido en la muestra con una proteasa, c) realización de un análisis bidimensional utilizando cromatografía de fase inversa acoplada con una espectrometría de masas de alta resolución (FT-ICR/FT-orbitrap) y análisis MS/MS de los fragmentos de la secuencia de aminoácidos de los péptidos, d) evaluación de los datos comparando las series de datos de LC-MS obtenidas para las muestras en paralelo con la serie de datos de una muestra de referencia, mediante la búsqueda de diferencias de las intensidades de señal en los tiempos de retención dados y por la evaluación de las señales diferenciales con respecto a las mutaciones en la secuencia de aminoácidos. La muestra de referencia para la evaluación de datos (etapa d) puede ser un patrón bien caracterizado o una de las muestras a analizar.

50 Un primer aspecto, descrito en el presente documento, es un método para determinar una variante de secuencia de aminoácidos, concretamente, una mutación en los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) proporción de al menos dos muestras del polipéptido,
 b) incubación de cada una de las muestras con una proteasa,
 c) análisis de las muestras incubadas por un análisis de datos bidimensional que comprende la combinación de separación por cromatografía en fase inversa con un análisis por espectrometría de masas y/o un análisis MS/MS,
 d) definición de la serie de datos obtenida con una muestra de la etapa c) como muestra de referencia y comparación de las series de datos obtenidas con las otras muestras de la etapa c) con la serie de datos de la muestra de referencia, por lo que cada diferencia determinada es una variante (mutación) de secuencia de aminoácidos del polipéptido y determina con ello una variante de secuencia de aminoácidos del polipéptido.

10 Otro aspecto, descrito en el presente documento, es un método para determinar una mutación en la secuencia de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- 15 a) proporción de al menos dos muestras del polipéptido,
 b) incubación de cada una de las muestras con una proteasa,
 c) análisis de las muestras incubadas por un análisis de datos bidimensional que comprende la combinación de separación por cromatografía en fase inversa con un análisis por espectrometría de masas y/o un análisis MS/MS,
 20 d) definición de la serie de datos obtenida con una muestra de la etapa c) como muestra de referencia y comparación de las series de datos obtenidas con las otras muestras de la etapa c) con la serie de datos de la muestra de referencia, por lo que cada diferencia determinada es una mutación en la secuencia de aminoácidos del polipéptido y determina con ello una mutación en la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

25 o las siguientes etapas:

- a) proporción de al menos una muestra del polipéptido,
 b) incubación de la muestras con una proteasa,
 30 c) análisis de la muestra incubada por un análisis de datos bidimensional que comprende la combinación de separación por cromatografía en fase inversa con un análisis por espectrometría de masas y/o un análisis MS/MS,
 d) comparación de la serie de datos obtenida con la muestra de la etapa c) con la serie de datos de la muestra de referencia determinada con un método descrito en las etapas b) y c), por lo que cada diferencia determinada es una mutación en la secuencia de aminoácidos del polipéptido y determina con ello una mutación en la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

40 Las muestras proporcionadas pueden proceder de diferentes clones obtenidos por transfección transitoria de un ácido nucleico que codifica el polipéptido, o de estirpes celulares transfectadas estables, o de estirpes celulares de diferente edad, o diferentes escalas de fermentación, o la fermentación se realiza en condiciones diferentes. En una realización se proporcionan entre 2 y 10.000 muestras, en otra realización se proporcionan entre 2 y 1.000 muestras, y en una realización adicional se proporcionan entre 2 y 348 muestras.

En una realización, el método comprende además una etapa:

- 45 e) determinación de la identidad y la posición de la variante (mutación) de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos por fragmentación y análisis de datos de MS/MS.

50 En otra realización, se proporciona una muestra adicional que comprende el polipéptido adicionado en el polipéptido con una variante (mutación) de secuencia de aminoácidos conocida. La muestra adicional se incuba, se analiza y compara además de las muestras proporcionadas. En una realización, el análisis se realiza a un valor de pH inferior a 8,0 y a una temperatura inferior a 40 °C. Estas condiciones reducen el método inducido por los cambios de la secuencia de aminoácidos. En una realización adicional, el valor del pH oscila de pH 6,5 a menos de pH 8,0. En otra realización, la temperatura oscila de 20 °C a 40 °C. En otra realización, la muestra se proporciona en un tampón tris (hidroximetil)aminometano para la digestión enzimática. En aún otra realización, la incubación de las muestras con una proteasa es una escisión del polipéptido por la proteasa en fragmentos de 3 a 60 restos de aminoácidos de longitud.

60 En una realización, la comparación en la etapa d) se realiza con los datos de uno, o una parte o la totalidad de los estados de carga de MS. En una realización adicional, la comparación comprende la superposición del cromatograma de iones totales con espectrometría de masas (MS-TIC) de la muestra de referencia y cada una de las otras muestras, por lo que se calcula la relación de intensidades de todas las masas superpuestas y alineadas, y los picos con una relación superior a 10 tienen que considerarse como variante de secuencia de aminoácidos (mutación en la secuencia de aminoácidos). En aún una realización adicional, la comparación comprende además la comparación del patrón peptídico de fragmentos proteolíticos de traducción de ADN del cromatograma de iones totales con espectrometría de masas (MS-TIC) de la muestra. Para la búsqueda de la variante de secuencia de aminoácidos (mutación en la secuencia de aminoácidos) se permiten sustituciones, deleciones e inserciones de

base únicas de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido investigado, se obtienen secuencias traducidas *in silico* y digeridas *in silico* con la misma enzima que se utiliza en el método. Posteriormente, las variantes de secuencia de aminoácidos (mutaciones en la secuencia de aminoácidos) se identifican comparando el espectro de fragmentos determinados experimentalmente por MS/MS de un péptido con los espectros de MS/MS teóricos del péptido derivado del proceso *in silico* que se ha descrito previamente.

En una realización adicional, el polipéptido es una inmunoglobulina completa, un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina. En otra realización, el polipéptido de las muestras se reduce y los residuos exentos de sulfhidrilo se carboximetilaron antes de la incubación con la proteasa.

Todas las muestras se tratan por separado, es decir, de forma individual y no como mezclas, en las etapas de acuerdo con los métodos que se describen en el presente documento. En una realización, las muestras se tratan individualmente en la etapa de reducción, en la etapa de incubación, y en la etapa de análisis. En una realización, el método es un método para la determinación de alto rendimiento.

En una realización, las muestras se incuban durante 16 horas a 18 horas con la proteasa e inmediatamente después se añade ácido fórmico o ácido trifluoroacético. En una realización adicional, las muestras se incuban durante 4 horas con la proteasa e inmediatamente después se añade ácido fórmico o ácido trifluoroacético.

Otro aspecto que se describe en el presente documento es un método para producir un polipéptido que comprende la etapa de seleccionar una célula que produce un polipéptido, por medio de la cual el polipéptido comprende el menor número y la menor relación, respectivamente, de variantes de secuencia de aminoácidos, es decir, mutaciones en la secuencia de aminoácidos, de todas las muestras procesadas. Otro aspecto que se describe en el presente documento es un método para producir un polipéptido que comprende la etapa de seleccionar una célula que produce un polipéptido, por medio de la cual el polipéptido comprende una mutación (variantes) en la secuencia de aminoácidos no detectable. En una realización, el menor número y la menor relación, respectivamente, de las variantes de secuencia de aminoácidos (mutaciones en la secuencia de aminoácidos) se determina con respecto a una muestra de referencia o a una secuencia de aminoácidos predeterminada.

En una realización, el método comprende las etapas de:

- a) proporción de al menos dos células que comprenden un ácido nucleico que codifica el polipéptido,
- b) depósito y cultivo individual de las células,
- c) realización con las células depositadas de forma individual de un método que se describe en el presente documento,
- d) selección de una célula que produce un polipéptido, por medio de la cual el polipéptido comprende el menor número, y/o la menor relación de variantes de secuencia de aminoácidos (mutaciones en la secuencia de aminoácidos),
- e) cultivo de la célula seleccionada,
- f) producción de un polipéptido por recuperación del polipéptido de la célula o medio de cultivo.

En una realización, la célula proporcionada se selecciona entre una célula transitoriamente transfectada, o una célula transfectada estable, o una célula inmunitaria obtenida a partir de un animal tras la inmunización.

Descripción detallada de la invención

Las proteínas terapéuticas, por ejemplo, producidas por métodos recombinantes, pueden ser una mezcla de moléculas con secuencias de aminoácidos algo diferentes, por lo que la diferencia reside no solo en el extremo C- o N-terminal de la secuencia de aminoácidos sino también en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, mutaciones en los aminoácidos, intercambios, oxidación o formación por tioéter). Las mutaciones (variantes) en la secuencia de aminoácidos pueden detectarse con un método descrito en el presente documento mediante la metodología de mapeo de péptidos. Estas mutaciones (variantes) en la secuencia de aminoácidos pueden surgir, por ejemplo, i) durante la replicación de ácidos nucleicos por errores de la polimerasa de ácido nucleico, o ii) durante la transcripción de ácidos nucleicos por errores de la ARN polimerasa o el aparato de corte y empalme, o iii) durante la traducción proteica por adquisición del ARNt incorrecto o por ARNts cargados con el aminoácido incorrecto, o iv) como modificación post-traducciona no deseada o eliminación incompleta del péptido señal. Por lo tanto, una mutación (variante) en la secuencia de aminoácidos puede ser resultado del proceso de integración/amplificación del ADN que codifica el polipéptido respectivo, o de la replicación del ácido nucleico codificante, o la transcripción que incluye la modificación post-transcripcional (por ejemplo, durante el corte y empalme del ARNm o edición del ARN) o durante la traducción. Las variantes de aminoácidos resultantes de una modificación de restos de aminoácidos individuales después de la liberación de la molécula del ribosoma se definen como una modificación post-traducciona no necesariamente indeseada y no son una mutación (variante) como se denomina en el presente documento.

A partir de la literatura se sabe que las enzimas eucariotas (así como procariotas) tienen una tasa media de error de:

replicación: -1 por 10^8 a 10^{12} bases de ácido nucleico replicadas por polimerasas normales,
 -1 por 10^1 a 10^3 bases de ácidos nucleicos replicadas por polimerasas propensas a error;

transcripción: 1 por 10^4 a 10^5 pares de bases de ácidos nucleicos transcritos;

5 traducción: 1 por 10^3 a 10^4 restos de aminoácidos incorporados.

10 Esto demuestra, por una parte, que las tasas de error durante la etapa de replicación por inducción de polimerasas propensas a error y, por otra parte, durante la traducción, tienen la mayor influencia, sobre todo, en combinación con el "estrés" ejercido sobre las células, por ejemplo, durante el proceso de selección tras la transfección o durante el crecimiento en presencia de un agente de selección. Adicionalmente, las mutaciones durante la traducción son acontecimientos estadísticos mientras que las mutaciones durante la replicación se originan en acontecimientos únicos con posiciones/emplazamientos estables. Es decir, los errores durante la replicación se producirán en una posición de las mutaciones (diferencias) en la secuencia de aminoácidos específica y reproducible, mientras que los errores de transcripción y traducción pueden producirse en las mutaciones (variantes) en los aminoácidos específicos sin posición y una distribución estadística de estos cambios sobre la molécula completa. Por último, también el proceso de transfección que incluye la integración en el genoma para obtener la célula recombinante da como resultado hasta un 1 % de ADN cambiado (véase, por ejemplo, Lebkowski, J. S., *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 4 (1984) 1951-1960). Esto resultará en una mutación (variante) específica de la posición antes de la replicación con una frecuencia de hasta 1:100.

20 En el presente documento se describe una preparación de la muestra, método de recogida y evaluación de datos utilizando el análisis de datos bidimensional que comprende un mapeo de péptidos basados en LC-MS/MS con una cobertura de la secuencia lo más alta posible con el fin de demostrar la composición correcta, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido y la cuantificación relativa de secuencias de aminoácidos potencialmente mutantes (variantes) frente a secuencias de aminoácidos no mutantes (no variantes). Cabe señalar que el método que se describe en el presente documento utiliza proteínas fragmentadas en vez de proteínas intactas o completas para el análisis. Esto aumenta la sensibilidad del método con respecto a la detección de niveles muy bajos de mutaciones. Esto también evita la interferencia y la necesidad de la distinción y la resolución de masas isobáricas de posibles mutaciones.

30 Para la determinación de una mutación (variante) en la secuencia de aminoácidos, son posibles dos posiciones iniciales diferentes:

35 Caso A: En caso de que una muestra caracterizada se encuentre disponible, esta puede elegirse como muestra de referencia y la muestra a determinar puede compararse con esta: el patrón peptídico conocido y la asignación de picos se utiliza como referencia y cada diferencia detectada en la muestra puede ser una mutación (variante) en la secuencia de aminoácidos. Dicho material de referencia puede ser un material de una estirpe celular bien caracterizada, por ejemplo, un proceso de fermentación definido.

40 Caso B: En caso de que ninguna muestra caracterizada se encuentre ya disponible

- a) para la asignación de picos, puede realizarse una caracterización completa de una muestra y el Caso A puede aplicarse/seguirse (Caso B-1); o
- 45 b) una muestra se elige arbitrariamente como muestra de referencia (Caso B-2) y las muestras restantes se comparan con esta; esto incluye la determinación de las diferencias, es decir mutaciones, tanto en la muestra de referencia como en las muestras sin referencia.

50 La muestra de referencia puede obtenerse de una estirpe celular diferente, o generación de la estirpe celular, o escala de cultivo, u obtenerse en condiciones de cultivo cambiadas/diferentes (tal como, por ejemplo, composición del medio).

55 En una realización, en caso de tener que analizarse un gran número de muestras, puede elegirse cualquier muestra como muestra de referencia y todas las demás muestras pueden agruparse de acuerdo con las mutaciones (variante) en la secuencia de aminoácidos determinada. Posteriormente, se realiza una caracterización detallada de cada grupo.

En una realización de todos los aspectos descritos en el presente documento, el polipéptido es una inmunoglobulina completa, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina.

60 Metodología general:

65 Una muestra que contiene el polipéptido a analizar se digiere con una proteasa, por ejemplo tripsina, originando fragmentos (péptidos) de la secuencia de aminoácidos característica. En una realización, el tamaño de los fragmentos de la secuencia de aminoácidos se inicia a partir de 3 o 4 restos de aminoácidos y hasta 60 restos de aminoácidos de longitud. En la segunda etapa se realiza una separación cromatográfica de los fragmentos de la secuencia de aminoácidos (cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa, RP-HPLC) acoplada a

espectrometría de masas de alta resolución (MS) utilizando la tecnología ion-ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR/FT-orbitrap) y análisis por espectrometría de masas (MS/MS) de los fragmentos de la secuencia de aminoácidos obtenidos en el espectrómetro de masas por disociación inducida por colisión (DIC). Esto es un análisis de datos bidimensional. Debido a las dos dimensiones del análisis, es decir, tiempo frente a masa, puede obtenerse una resolución mejorada. El análisis bidimensional también permite que una baja resolución de la separación por cromatografía líquida pueda aceptarse antes de que pueda resolverse el análisis por MS como picos superpuestos durante el análisis por MS.

Las series de datos de HPLC-MS obtenidas se comparan después, es decir, una comparación de los patrones de elución de los fragmentos de la secuencia de aminoácidos y los patrones de masa a carga (m/z) de las muestras y la identificación de las mutaciones, es decir, diferencias, se realiza por un análisis de los espectros de los fragmentos de MS/MS. En caso de realizarse un análisis basado en la muestra de referencia, se han de realizar la identificación de los fragmentos de aminoácidos, la asignación de picos y/o la determinación de la cobertura de secuencia, además de la detección de los fragmentos de la secuencia de aminoácidos que contienen mutaciones (variantes) en la secuencia de aminoácidos y su cuantificación relativa. En una realización, el polipéptido es una inmunoglobulina o un polipéptido sin inmunoglobulina.

Con el método descrito en el presente documento, pueden determinarse la composición de una muestra y la fracción de moléculas con las mutaciones (variantes) en la secuencia de aminoácidos de la misma. También puede realizarse una determinación cualitativa de la consistencia de una muestra al comparar los datos de fragmentación por espectrometría de masas determinados experimentalmente con las masas de los fragmentos de la secuencia de aminoácidos teórica obtenidas por digestión proteolítica *in silico* del polipéptido y sus variantes y posterior simulación de la fragmentación inducida por colisión. Finalmente, puede obtenerse una secuencia con mutaciones (variantes) propuestas y posiciones de mutación (variante) y se confirmó mediante la evaluación de datos manual. Una vez identificada una mutación (variante) en la secuencia de aminoácidos, puede cuantificarse con respecto a la secuencia de aminoácidos no modificada utilizando los datos de uno, o una parte o la totalidad de los estados de carga de MS.

Se ha hallado mediante el empleo de experimentos de adición, que el método descrito en el presente documento, tiene un límite total de detección de al menos 0,1-1,0 % de secuencia de aminoácidos mutante (variantes). Además, se ha descubierto que resulta, por una parte, ventajoso para evitar los valores de pH básicos y las altas temperaturas durante la preparación de la muestra con el fin de evitar la desamidación, es decir, modificaciones inducidas por el método. Por lo tanto, en una realización del método descrito en el presente documento, el método se realiza en el intervalo de pH básico neutro y débil, es decir, a un valor de pH inferior a pH 8,0 y superior a un pH 6,5, y a temperaturas moderadas, es decir, a temperaturas inferiores a 40 °C. Se ha descubierto además que, a medida que una realización utiliza un tampón tris(hidroximetil)aminometano en lugar de un tampón amoníaco-bicarbonato utilizado habitualmente para el análisis de masas menos el método, se obtienen artefactos dependientes.

El método actual utiliza series de datos de LC-MS para la determinación y permite la detección e identificación de una o más mutaciones (variantes) en los aminoácidos en una digestión triptica de un polipéptido de muestra. Para la identificación pueden utilizarse los datos de MS/MS y el método de "búsqueda tolerante a errores" identifica las mutaciones (variantes) en la secuencia de aminoácidos en base a un intercambio, inserción o delección de ácido nucleico único. De manera análoga, también es posible identificar fragmentos y algunas otras modificaciones conocidas.

Este enfoque comparativo puede reducir drásticamente el tiempo necesario para el análisis, ya que solo tienen que analizarse específicamente las diferencias. Asimismo, en caso de seleccionarse, la muestra de referencia tiene que analizarse solo una vez. Si se presentan muchas mutaciones (diferencias) en las muestras, estas pueden agruparse por modificaciones y pueden analizarse muestras representativas de cada grupo.

Método detallado:

En la siguiente realización específica se describen todos los métodos descritos en el presente documento.

Las muestras pueden reducirse mediante la adición de ditiotreitol (DDT). También los residuos exentos de sulfhidrilo pueden carboximetilarse por ácido yodoacético. Después, el tampón de la muestra puede intercambiarse y ajustarse para la digestión enzimática. La muestra puede digerirse enzimáticamente durante la noche (16 a 18 horas) y la digestión puede detenerse mediante la adición de ácido trifluoroacético. La muestra digerida puede someterse a una separación por RP-HPLC y análisis de espectrometría de masas de alta resolución de los fragmentos de la secuencia de aminoácidos separada (utilizando, por ejemplo, un espectrómetro de masas FT-ICR/FT-orbitrap).

La expresión "serie de datos", como se utiliza en el presente documento, denota las relaciones masa a carga obtenidas resueltas en el tiempo durante la elución cromatográfica en un espectrómetro de masas por ionización de los fragmentos de la secuencia de aminoácidos resueltos en el tiempo y digeridos, contenidos en una muestra con el fin de generar moléculas cargadas o fragmentos cargados. La serie de datos comprende al menos un cromatograma

de iones totales con espectrometría de masas (MS-TIC) y los datos de espectrometría de masas en tándem (datos de MS/MS) se obtienen por disociación inducida por colisión de las moléculas parentales.

Caso A:

5 Las muestras a evaluar se analizan junto con una muestra de referencia disponible. Cada muestra y la muestra de referencia deben determinarse al menos dos veces. Como control positivo, una muestra que es similar a la muestra de referencia, es decir, contiene una o dos mutaciones (variantes) en las secuencias de aminoácidos, se adiciona a la muestra de referencia y se utiliza como secuencia (variante) de aminoácidos mutante artificial. La secuencia de aminoácidos mutante artificial (variante) se adiciona a la muestra de referencia, en una realización en 0,5 % (p/p), para la confirmación de la sensibilidad total del método. Para establecer los parámetros del método de análisis, pueden compararse los resultados obtenidos con la muestra de referencia, es decir, el polipéptido producido de manera recombinante sin una mutación (modificación) o con el patrón de mutación (modificación) conocida, y con la muestra de referencia adicionada en la secuencia de aminoácidos mutante con la mutación (variante) en la secuencia de aminoácidos artificial. Con estos parámetros puede llevarse a cabo el siguiente análisis.

Para la determinación puede superponerse el cromatograma de iones totales (CIT) de la muestra de referencia y una muestra a analizar y pueden compararse las intensidades de señal de las señales de masa correspondientes a un tiempo de retención dado (es decir, tiempo de retención y masa relacionada). Por consiguiente, en una realización, el análisis y/o la determinación es un análisis bidimensional que utiliza una separación de acuerdo con el tiempo de retención y la masa cromatográficos (valor m/z). Se pueden calcular las relaciones de intensidad, es decir, las relaciones de las intensidades de señal de la muestra a las intensidades de señal de la muestra de referencia de todas las masas superpuestas/alineadas. Esta relación puede representarse contra el tiempo de retención, por el cual:

25 a) se indican los picos de la misma masa y con la misma intensidad de la muestra de referencia y de la muestra con valores de aproximadamente 1, a través de los cuales las masas presentes con mayor frecuencia en la muestra a analizar se indican con valores superiores a 1,
 b) todas las masas con un valor superior a 1, se identifican en una realización con un valor de más de 3, o más de 10, o más de 100, en una realización con un valor comprendido entre 10 y $5 \cdot 10^9$, en otra realización con un valor comprendido entre 100 y $5 \cdot 10^9$, por lo cual, para la identificación, se utilizan todos los espectros de MS/MS correspondientes a la masa parental y también se tienen en cuenta los diferentes estados de carga,
 c) puede llevarse a cabo la cuantificación de una secuencia (variante) de aminoácidos mutante mediante el uso de uno, una parte o la totalidad de los estados de carga en el espectro de masas relativos entre sí, con lo cual para la secuencia de aminoácidos natural y la secuencia (variante) de aminoácidos mutante se elige el mismo estado de carga, se generan los cromatogramas de iones extraídos (CIEs) y el área bajo la curva de los picos correspondientes entre sí en los CIEs se cuantifica relativamente entre sí de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{100}{\text{secuencia de aminoácidos natural} + \text{secuencia de aminoácidos mutante}} \cdot \text{secuencia de aminoácidos mutante}$$

40 En todas las realizaciones, la ventana m/z utilizada para el análisis es la masa respectiva más/menos 1,6 uma m/z. Con el fin de garantizar que los datos puedan ser procesados de manera oportuna en todas las realizaciones, se establece una relación de 3 como umbral, es decir, todas las relaciones inferiores a este límite no se analizan.

45 Caso B:

En este caso la muestra caracterizada ya no se encuentra disponible. Para una de las muestras proporcionadas que se van a analizar (en este caso tiene que estar disponible más de una muestra a analizar), puede realizarse una alineación de todas las masas determinadas en el CIT con el patrón peptídico determinado teóricamente, es decir, puede realizarse una asignación de picos (con proteasa predeterminada para la digestión). Para la alineación correcta puede ser importante, por una parte, la masa exacta, y por otra parte, la cobertura del fragmento de MS/MS para la confirmación de la secuencia de las sugerencias peptídicas. En una realización específica, las mutaciones (variantes) en las secuencias de aminoácidos pueden identificarse por una búsqueda tolerante a errores añadiendo o restando, respectivamente, cada masa teórica calculada de la secuencia de aminoácidos natural, las diferencias de masas resultantes de una mutación de ácidos nucleicos, es decir, sustitución, delección o inserción de un único nucleótido, en un triplete de bases (codón) que da lugar a una diferencia en la secuencia de aminoácidos. Posteriormente, una mutación (variante) en la secuencia de aminoácidos sugerida tiene que confirmarse por el patrón de fragmentación de MS/MS. Con ello, no solo tiene que cubrirse la identidad de la mutación (diferencia) en la secuencia de aminoácidos, sino también la posición de la mutación (cambio) de aminoácidos por las masas de los fragmentos en el análisis por MS/MS.

No obstante, la asignación de picos completa de la serie de datos de LC-MS no es obligatoria y solo pueden analizarse las diferencias. Las muestras restantes pueden compararse con la muestra analizada como se ha descrito anteriormente.

Se puede llevar a cabo la cuantificación de una secuencia (variante) de aminoácidos mutante mediante el uso de uno, una parte o la totalidad de los estados de carga en el espectro de masas relativos entre sí, con lo cual para la cada una de la secuencia de aminoácidos natural y la secuencia (variante) de aminoácidos mutante, se elige el mismo estado de carga, se generan los cromatogramas de iones extraídos (CIEs) y el área bajo la curva de los picos correspondientes entre sí en los CIEs se cuantifica relativamente entre sí de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{100}{\text{secuencia de aminoácidos natural} + \text{secuencia de aminoácidos mutante}} \times \text{secuencia de aminoácidos mutante}$$

Con el método que se describe en el presente documento, se encuentra disponible un método para la identificación de las mutaciones (variantes) en la secuencia de aminoácidos determinado por el intervalo del subporcentaje. La sensibilidad total se determinó que era al menos de aproximadamente 0,5 %, en función de la naturaleza del fragmento de la secuencia de aminoácidos. En algunos casos, la sensibilidad podría caer por debajo de 0,5 % (por ejemplo, para los fragmentos de la secuencia de aminoácidos con buenas propiedades de cromatografía y/o ionización). En estudios del caso, pueden detectarse variantes entre 0,1 % y 10 %, en algunos casos, hasta 0,02 %. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante una combinación definida de herramientas informáticas necesarias para lograr resultados significativos y fiables.

En caso de detección de mutaciones (variantes) en la secuencia de aminoácidos, los resultados positivos falsos pueden descartarse mediante la confirmación de la detección por:

- aislamiento del polipéptido que contiene la mutación (variante) en la secuencia de aminoácidos del mapa peptídico y la realización de la secuenciación de Edman,
- sintetización del péptido con la mutación (variante) en los aminoácidos y adición en el polipéptido para el análisis por MS y MS/MS que confirma la retención y el perfil de MS/MS,
- confirmación de la presencia por secuenciación del ADN de la muestra respectiva que produce el clon celular,
- digestión con una enzima proteolítica diferente y análisis de los fragmentos obtenidos con la misma.

Ejemplo de un experimento de adición:

La evaluación de la sensibilidad para la detección de polipéptidos con mutaciones (variantes) se realizó con un polipéptido modelo, un anticuerpo monoclonal (AM), adicionado en un segundo AM con mutaciones (variante) en la secuencia de aminoácidos a varias relaciones, es decir, en diversas concentraciones. En un ejemplo, el AM con una mutación (variante) en la secuencia de aminoácidos se adicionó en 1 % (p/p), es decir, se espera que dos péptidos diferentes se identifiquen por el método que se describe en el presente documento.

AM	péptido de CL	XXIXXXX
AM mutante	péptido de CL	XXVXXXX
AM	péptido de CP	XXXXXXXXXXXTXXXXX
AM mutante	péptido de CP	XXXXXXXXXXIXXXXX

En un segundo ejemplo, el AM mutante (variante) se adicionó a relaciones diferentes (0,5-10 %) en el AM, es decir, se espera 17 péptidos mutantes (variantes) diferentes.

Por consiguiente, en el presente documento, se describe un método para determinar un polipéptido con una secuencia de aminoácidos mutante, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- a) proporción de al menos dos muestras del polipéptido,
- b) incubación de cada una de las muestras con la misma proteasa,
- c) análisis de las muestras incubadas por un análisis de datos bidimensional utilizando una combinación de separación por cromatografía líquida en fase inversa, y un análisis por espectrometría de masas y/o un análisis MS/MS,
- d) definición de la serie de datos obtenida con una muestra de la etapa c) como muestra de referencia y comparación de las series de datos obtenidas con las otras muestras de la etapa c) con la serie de datos de la muestra de referencia, por lo que cada diferencia en la secuencia de aminoácidos determinada es una mutación en la secuencia de aminoácidos del polipéptido y determina con ello un polipéptido con una secuencia de aminoácidos mutante.

En todas las realizaciones, cada diferencia en la secuencia de aminoácidos con una relación de más de 3 de la intensidad de la señal del espectro de masas de la muestra a la intensidad de la señal del espectro de masa de referencia es una mutación en la secuencia de aminoácidos. En todas las realizaciones, el ancho del marco m/z utilizada en el análisis es igual o superior a 1,6. En una realización adicional, el método comprende además una etapa e) de determinación de la identidad y la posición de la mutación en los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos por el análisis MS/MS. En una realización, también se proporciona una muestra adicional que comprende el polipéptido adicionado en el polipéptido con una mutación (variante) en la secuencia de aminoácidos

conocida y la muestra adicional se incuban, se analiza y se compara además de las muestras proporcionadas. En una realización, el análisis se realiza a un valor de pH inferior a 8,0 y a una temperatura inferior a 40 °C. En otra realización, las muestras se proporcionan en un tampón tris(hidroximetil)aminometano. En una realización, también la incubación de las muestras con una proteasa es una escisión del polipéptido por la proteasa en fragmentos de secuencia de aminoácidos de 3 a 60 restos de aminoácidos de longitud. En una realización, la comparación en la etapa d) se realiza con los datos de uno, o una parte o la totalidad de los estados de carga de MS. En una realización, el polipéptido es una inmunoglobulina, un fragmento de inmunoglobulina o un conjugado de inmunoglobulina. En otra realización, las muestras se incuban durante 16 horas a 18 horas con la proteasa, y después se añade ácido fórmico o ácido trifluoroacético. En una realización adicional, las muestras se incuban durante 4 horas con la proteasa, y después se añade ácido fórmico o ácido trifluoroacético. En una realización la comparación también comprende la superposición del cromatograma de iones totales con espectrometría de masas (MS-TIC) de la muestra de referencia y cada una de las otras muestras a analizar, por lo que se calcula la relación de intensidad de todas las masas superpuestas y alineadas, de modo que los picos con una relación de más de 3, en concreto, más de 10, se evalúan como mutación en la secuencia de aminoácidos. En una otra realización, la comparación comprende además la comparación del patrón peptídico de fragmentos proteolíticos de traducción de ADN de la secuencia de aminoácidos teórica y del cromatograma de iones totales con espectrometría de masas (MS-TIC) de la muestra a analizar, y las mutaciones en la secuencia de aminoácidos se identifican añadiendo, o restando, respectivamente, cada masa teórica calculada de la secuencia de aminoácidos teórica, las diferencias de masas resultantes de una mutación, delección o inserción de ácido nucleico en un triplete de bases (codón) con un cambio de aminoácidos.

Un aspecto adicional que se describe en el presente documento es un método para producir un polipéptido que comprende la siguiente etapa:

- seleccionar una célula que produce un polipéptido, por la que el polipéptido comprende el menor número o relación, respectivamente, de mutaciones en la secuencia de aminoácidos de todas las muestras procesadas o con respecto a una muestra de referencia o secuencia predeterminada de aminoácidos determinada con un método descrito en el presente documento.

Asimismo un aspecto descrito en el presente documento es un método para producir una inmunoglobulina que comprende las etapas de:

- a) proporción de al menos dos células que comprenden un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina,
- b) depósito y cultivo individual de las células,
- c) realización de un método que se describe en el presente documento,
- d) selección de una célula que produce una inmunoglobulina, por medio de la cual la inmunoglobulina comprende el menor número o relación, respectivamente, de mutaciones en la secuencia de aminoácidos con respecto a una muestra de referencia,
- e) cultivo de la célula,
- f) producción de un polipéptido por recuperación del polipéptido de la célula o medio de cultivo.

Los siguientes ejemplos, listado secuencial y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción del listado secuencial

- SEQ ID NO: 01 dominio variable de la cadena pesada 1 del anticuerpo anti-CCR5.
- SEQ ID NO: 02 dominio variable de la cadena ligera 1 del anticuerpo anti-CCR5.
- SEQ ID NO: 03 dominio variable de la cadena pesada 2 del anticuerpo anti-CCR5.
- SEQ ID NO: 04 dominio variable de la cadena ligera 2 del anticuerpo anti-CCR5.
- SEQ ID NO: 05 dominio variable de la cadena pesada 3 del anticuerpo anti-CCR5.
- SEQ ID NO: 06 dominio variable de la cadena ligera 3 del anticuerpo anti-CCR5.
- SEQ ID NO: 07 región constante de la IgG1 humana.
- SEQ ID NO: 08 región constante de la IgG4 humana.
- SEQ ID NO: 09 dominio constante de la cadena ligera kappa humana.
- SEQ ID NO: 10 dominio constante de la cadena ligera lambda humana.

Descripción de las Figuras

- Figura 1 Una secuencia temporal representativa del ciclo de acontecimiento de exploración para la adquisición dependiente de datos de espectros de MS/MS; abreviaturas: FT ICR - resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier; TIL - trampa de iones lineal; DIC - disociación inducida por colisión; PR - poder de resolución; DIF - disociación inducida por fuente.
- Figura 2 Cromatograma de iones totales de mapas de péptidos trípticos de un anticuerpo de referencia anti-CD 19 (referencia) y un anticuerpo de muestra anti-CD 19 (muestra) adquirido en un LTQ FT ICR (Thermo Scientific).

- Figura 3 Superposición de los cromatogramas de LC-MS alineados por tiempo de retención de picos prominentes. Los datos procedían de mapas de péptidos trípticos de dos anticuerpos anti-CD 19 (referencia y muestra). A y B son perfiles medios de CIT de dos replicados cada uno.
- Figura 4 Diagrama de dispersión que muestra las diferencias entre el anticuerpo anti-CD 19 de muestra y referencia.
- Figura 5 Zoom de la Figura 4.
- Figura 6 Espectro de MS/MS asignado del fragmento de la secuencia de aminoácidos de CP del anticuerpo anti-CD 19 de muestra (sucesión y-ion y sucesión b-ion de la disociación inducida por colisión del ion padre doblemente cargado). Los fragmentos de MS/MS característicos para la variante de secuencia de aminoácidos se muestran en negrita.
- Figura 7 Espectro de MS/MS asignado del fragmento de la secuencia de aminoácidos de CL del anticuerpo anti-CD 19 de muestra (sucesión y-ion y sucesión b-ion de la disociación inducida por colisión del ion padre doblemente cargado). Los fragmentos de MS/MS característicos para la variante de secuencia de aminoácidos se muestran en negrita.
- Figura 8 Cromatograma de iones extraídos de la secuencia de aminoácidos natural y la secuencia de aminoácidos del fragmento de la secuencia de aminoácidos de CP del anticuerpo anti-CD 19 de muestra en el ensayo de la muestra LC-MS. Resultado de cuantificación: está presente en la muestra un 2 % en peso de la secuencia de aminoácidos mutante (variante).
- Figura 9 Cromatograma de iones extraídos de la secuencia de aminoácidos natural y el fragmento de la secuencia de aminoácidos de CL del anticuerpo anti-CD 19 de muestra en el ensayo de la muestra LC-MS. Resultado de cuantificación: está presente en la muestra un 0,5 % en peso de la secuencia de aminoácidos mutante (variante).
- Figura 10 Superposición de los cromatogramas de LC-MS alineados por tiempo de retención de picos prominentes. Los datos procedían de mapas de péptidos trípticos de dos anticuerpos anti-CCR5 (referencia y muestra).
- Figura 11 Diagrama de dispersión que muestra las diferencias entre el anticuerpo anti-CCR5 de muestra y referencia.
- Figura 12 Cromatograma de iones extraídos de la secuencia de aminoácidos natural y el fragmento de aminoácidos de CL del anticuerpo anti-CCR5 de muestra en el ensayo de la muestra LC-MS.
- Figura 13 Cromatograma de iones extraídos de la secuencia de aminoácidos natural y el fragmento de aminoácidos de CP del anticuerpo anti-CCR5 de muestra en el ensayo de la muestra LC-MS.

Ejemplo 1

35 Materiales y métodos

Método de preparación de muestra para la referencia y la muestra:

a) Reducción y alquilación:

40 Se diluyeron 250 µg de inmunoglobulina en un volumen de máximo 100 µl con tampón de desnaturalización (Tris-HCl 0,4 M, clorhidrato de guanidina 8,0 M, pH 8) a un volumen final de 240 µl. 20 µl de ditiotreitól (240 mM en tampón de desnaturalización) se añadieron a la solución y la mezcla se incubó a 37 °C ± 2 °C durante 60 minutos. Después se añadieron 20 µl de una solución de ácido yodoacético (0,6 M en agua purificada), se mezclaron vigorosamente y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción de alquilación se detuvo mediante la adición de 30 µl de una solución de ditiotreitól (240 mM en tampón de desnaturalización).

b) Intercambio de tampón:

50 El tampón de 300 µl (aproximadamente 250 µg o 3,2 nmol) de una solución que comprende la inmunoglobulina carboximetilada reducida, desnaturalizada se intercambió utilizando una columna de desalación NAP™ 5 Sephadex™ G-25. Brevemente, la columna se equilibró con 10 ml de una solución tampón que comprende 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, la muestra se aplicó a la columna, la columna se lavó con 350 µl de la solución tampón previa y la muestra se recuperó en aproximadamente 480 µl. Entre cada etapa (equilibrio de la columna, aplicación de la muestra, lavado y elución), la solución se introdujo en el lecho de la columna empaquetada completamente.

c) Digestión enzimática:

60 Se añadieron 48 µl de una solución de tripsina (0,2 g/l en Tris-HCl, pH 7,5) a la solución de inmunoglobulina intercambiada en el tampón y se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente. La digestión se detuvo mediante la adición de 20 µl de solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 10 % (v/v).

Método de adquisición de datos de LC-MS/MS:

65 El análisis LC-MS/MS se realizó mediante una separación cromatográfica (LC) de los péptidos hidrolíticos obtenidos en las etapas de digestión tríptica seguida por MS y detección MS/MS, respectivamente, utilizando una fuente de

iones nano ESI de Advion Biosciences como una interfaz entre HPLC y espectrómetro de masas.

La cromatografía se llevó a cabo con los siguientes parámetros:

HPLC:	Dionex Ultimate 3000
Caudal:	40 µl/min
Longitud de onda de detección UV:	220 nm y 280 nm
Temperatura del horno para columna:	35 °C
Bucle de muestra:	10 µl
Columna:	Dionex pep Map C18, 3 µm, 100 Å, 1 x 150 mm
Volumen de inyección:	10 µl
<hr/>	
Eluyente A = agua de calidad gradiente de HPLC que contiene ácido fórmico al 0,1 %	
Eluyente B = acetonitrilo de calidad gradiente de HPLC que contiene ácido fórmico al 0,1 %	

5 El gradiente aplicado procedía de un eluyente B al 5 % en volumen a un eluyente B al 100 % en volumen en 75 minutos.

Se llevó a cabo nano ESI MS o MS/MS con los siguientes parámetros:

Fuente nano ESI:	Triversa NanoMate (Advion)
Flujo en la fuente de iones del espectrómetro de masas:	aprox. 200 nl/min gestionado por un divisor
Presión de gas:	0,1-0,5 psi
Tensión a aplicar:	1,1-1,7 kV
Ion positivo:	seleccionado

La detección de espectrometría de masas se llevó a cabo con los siguientes parámetros:

Instrumento:	ESI LTQ FT-ICR (Thermo Scientific)
Temperatura capilar:	175 °C
Energía de colisión en trampa iónica para MS/MS:	40 %
Tensión de la lente del tubo:	100 V
Característica dinámica de exclusión:	habilitada (recuento de repeticiones: 1, duración de exclusión: 8 s, ancho de masas de exclusión: 3 ppm).

15 En la Figura 1 se muestra una secuencia temporal representativa del ciclo del acontecimiento de exploración para la adquisición dependiente de datos de espectros MS/MS.

20 El intervalo de adquisición de datos era de 350-2.000 m/z para espectros de MS. Se utilizó el intervalo M/Z para espectros de MS/MS de acuerdo con los ajustes del instrumento convencional. El número de espectros de MS/MS por exploración FT de alta resolución puede variar entre 3 a 5. La exploración DIF no es obligatoria para este tipo de análisis.

Ejemplo 2

25 Análisis del anticuerpo anti-CD 19 de referencia y muestra

Generación de datos:

30 La referencia y la muestra del anticuerpo anti-CD 19 se han tratado de acuerdo con la sección Materiales y Métodos. Los datos de MS se han adquirido de acuerdo con la sección de Materiales y Métodos.

Análisis de datos:

35 a) Detección de las diferencias entre la referencia y la muestra utilizando series de datos de LC-MS

40 Para la comparación de los perfiles de masas obtenidos para la referencia y la muestra (cromatogramas de iones totales (CIT), véase la Figura 2) se ha utilizado el paquete de software SIEVE™ (versión 1.1.0 de Thermo Scientific). En pocas palabras, las series de datos de CIT de la referencia y la muestra se alinearon por el tiempo de retención (Figura 3) y se compararon para las intensidades de pico de masa en una ventana de tiempo de retención preestablecida determinadas por un umbral predeterminado (Figuras 4 y 5).

45 Las señales de masas diferentes en la referencia y en la muestra de acuerdo con los parámetros predefinidos para la evaluación se enumeran en la Tabla 1. Las señales de masas presentes a intensidades idénticas en la referencia y en la muestra aparecen en una relación de 1. Las señales de masas con una intensidad mayor en la muestra que en la referencia (por ejemplo, mutaciones puntuales de aminoácidos) aparecen con relaciones mayores a 1. Las relaciones se calcularon dividiendo la intensidad total de la señal en m/z dada frente al marco del tiempo de

retención de la muestra por la intensidad correspondiente en la referencia. Si la intensidad total de la señal en m/z dada frente al marco del tiempo de retención de la referencia es cero (por ejemplo, no hay señal alguna de fondo debido a la reducción activa de ruido durante la adquisición de datos), la relación es igual a la intensidad total de la señal de la muestra en el correspondiente marco (por ejemplo, 2-10 coincidencias en la Tabla 1).

5

Tabla 1: Datos para todos los picos diferenciales con una relación > 50.

N.º	inicio m/z	detención m/z	tiempo de inicio	tiempo de detención	relación	interpretación manual
1	1.061,19	1.062,79	20,7385	21,0385	140.043	mutación 1; z = 1
2	1.441,94	1.443,54	36,043	36,343	68.943	antecedente, sin péptido relacionado, sin desencadenamiento MS/MS
3	1.989.61	1.991.21	36,0909	36,3909	59.552	antecedente, sin péptido relacionado, sin desencadenamiento MS/MS
4	1.864,12	1.865,72	36,0909	36,3909	55.943	antecedente, sin péptido relacionado, sin desencadenamiento MS/MS
5	890,645	892,245	36,0909	36,3909	52.340	antecedente, sin péptido relacionado, sin desencadenamiento MS/MS
6	1.718,96	1.720,56	36,0909	36,3909	52.235	antecedente, sin péptido relacionado, sin desencadenamiento MS/MS
7	1.347,59	1.349,19	36,0909	36,3909	45.291	antecedente, sin péptido relacionado, sin desencadenamiento MS/MS
8	1.110,76	1.112,36	36,0909	36,3909	45.107	antecedente, sin péptido relacionado, sin desencadenamiento MS/MS
9	1.235,23	1.236,83	44,5509	44,8509	36.205	antecedente, sin péptido relacionado, sin desencadenamiento MS/MS
10	965,611	967,211	36,0909	36,3909	33.871	antecedente, sin péptido relacionado, sin desencadenamiento MS/MS
11	606,874	608,474	44,0258	44,3258	798	mutación 2; z = 3
12	607,21	608,81	43,8741	44,1741	571	mutación 2; z = 3
13	606,875	608,475	44,2013	44,5013	261	mutación 2; z = 3
14	910,713	912,313	44,0258	44,3258	194	mutación 2; z = 2
15	607,879	609,479	44,0258	44,3258	143	mutación 2; z = 3
16	910,218	911,818	43,8741	44,1741	108	mutación 2; z = 2
17	601,538	603,138	45,6276	45,9276	96	no identificado
18	735,059	736,659	53,367	53,667	42	presente en los ensayos de LC-MS aunque con solo un ligera intensidad diferente
19	1.022,27	1.023,87	6,84557	7,14557	40	presente en los ensayos de LC-MS aunque con solo un ligera intensidad diferente

Los parámetros utilizados para la comparación de los datos de LC-MS de referencia y de muestra con SIEVE fueron los siguientes:

10

Ancho del marco m/z: 1,6
 Ancho del marco de tiempo: 0,3 min
 Umbral de intensidad: 10.000
 Inicio m/z: 350
 Final m/z: 2.000
 Ancho del pico de búsqueda: 30 %
 Inicio del tiempo de retención: 5 min
 Detención del tiempo de retención: 60 min

Estos parámetros se han optimizado para distinguir las coincidencias relacionadas con la diferencia de la secuencia de aminoácidos a partir de un falso positivo, es decir, coincidencias relacionadas con la diferencia en la secuencia no aminoácida. Solo tienen que ajustarse de acuerdo con los parámetros actuales de los datos de LC-MS que son:

15

- i) resolución cromatográfica (ancho del marco de tiempo), y
- ii) sensibilidad del instrumento utilizado y el ruido de fondo (umbral de intensidad).

20

Además, la sensibilidad requerida del método, por ejemplo, para la detección de secuencias (variantes) de aminoácidos mutantes muy poco significativas, determina el umbral de intensidad a establecer. Utilizando, por

ejemplo un instrumento LTQ FT ICR, se han identificado secuencias (variantes) mutantes de hasta 0,2 % de frecuencia absoluta.

b) Identificación de las diferencias entre la referencia y la muestra utilizando los datos de MS/MS

Se comprobó la identificación de las diferencias encontradas utilizando el procedimiento descrito en el primer párrafo anterior de todo el grupo de picos de isótopos por ser típica de los péptidos. A continuación, se comprobó si se ha seleccionado la señal de m/z respectiva para la generación de la fragmentación de MS/MS y si se identificó por medio de la búsqueda tolerante a error de Mascot (Mascot ETS). Cada variante de secuencia tentativa identificada por Mascot ETS se comprobó y confirmó manualmente utilizando los espectros iónicos del fragmento de MS/MS obtenidos (véase la Figura 6 y la Figura 7).

Alternativamente, si los datos de MS/MS se han registrado y Mascot ETS no propuso una secuencia, se aplicó de forma manual o mediante el uso de software una secuenciación *de novo*.

c) Cuantificación de secuencias (variantes) de aminoácidos mutantes identificadas

La secuencia (variante) de aminoácidos mutante identificada se cuantificó en el nivel del fragmento de secuencia de aminoácidos (tríptico) que contiene la mutación (variante) y en relación con el fragmento de la secuencia de aminoácidos original, no mutada en la misma muestra (véase la Figura 8 y la Figura 9). Dos cromatogramas de iones extraídos (CIEs) se generaron a partir de los datos de LC-MS de la muestra, uno para la muestra y uno para la muestra de referencia. Los cromatogramas de iones extraídos (CIEs) incluyen todos los estados de carga y todos los picos isotópicos del péptido respectivo. Los picos generados por los respectivos CEIs se integraron utilizando el software del instrumento (XCalibur), y las áreas calculadas por la presente se utilizan en la siguiente fórmula:

Porcentaje (variante de secuencia) =

$$\frac{100}{\text{secuencia de aminoácidos natural} + \text{secuencia de aminoácidos mutante}} * \text{secuencia de aminoácidos mutante}$$

En la que se utiliza el área del pico del cromatograma de iones extraídos teniendo en cuenta todos los estados de carga y todos los picos isotópicos.

Ejemplo 3

Análisis del anticuerpo anti-CCR5 de referencia y muestra

Para la determinación de un cambio (mutación) de un único aminoácido en los dominios variables, es decir, dominio variable de cadena ligera y dominio variable de cadena pesada, se ha empleado un anticuerpo anti-CCR5. El primer anticuerpo anti-CCR5 o el anticuerpo anti-CCR5 de referencia tiene una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera seleccionada a partir de los pares de la SEQ ID NO: 01 y 02, SEQ ID NO: 03 y 04, y SEQ ID NO: 05 y 06. El segundo anticuerpo anti-CCR5 o el anticuerpo anti-CCR5 de muestra tiene las siguientes mutaciones (cambios) en los aminoácidos: en el dominio variable de cadena pesada (VP), el residuo de isoleucina en la posición del aminoácido 109 se muta (cambia) a treonina (VP-I109T), en el dominio variable de cadena ligera (VL), el residuo de valina en la posición del aminoácido 52 se muta (cambia) a isoleucina (VL-V52I).

El anticuerpo anti-CCR5 de muestra se ha adicionado en un 1 % en peso al anticuerpo anti-CCR5 de referencia.

a) Detección de las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de referencia y de muestra utilizando series de datos de LC-MS

Para la comparación de los perfiles de masas obtenidos para la referencia y la muestra (cromatogramas de iones totales (CITs), se ha utilizado el paquete de software SIEVE™ (versión 1.1.0 de Thermo Scientific). En pocas palabras, las series de datos de la referencia y la muestra se alinearon cromatográficamente por el tiempo de retención (Figura 10) y se compararon para las intensidades de pico de masa en una ventana de tiempo de retención preestablecida determinadas por un umbral predeterminado (Figura 11).

Las diferencias en las señales de masas de referencia y de muestra de acuerdo con los parámetros predefinidos para la evaluación se enumeran en la Tabla 2. Las señales de masas presentes a intensidades idénticas en la referencia y en la muestra aparecen en una relación de 1. Las señales de masas con una intensidad mayor en la muestra que en la referencia (por ejemplo, mutaciones puntuales de aminoácidos) aparecen con relaciones mayores a 1. Las relaciones se calcularon dividiendo la intensidad total de la señal en m/z dada frente al marco del tiempo de retención de la muestra por la intensidad correspondiente en la referencia. Si la intensidad total de la señal en m/z

dada frente al marco del tiempo de retención de la referencia es cero (por ejemplo, no hay señal alguna de fondo debido a la reducción activa de ruido durante la adquisición de datos), la relación es igual a la intensidad total de la señal de la muestra en el correspondiente marco.

5

Tabla 2: Datos para picos diferenciales

N.º	inicio m/z	detención m/z	tiempo de inicio	tiempo de detención	relación	interpretación manual
1	947,913	947,933	39,6552	42,1552	429464	mutación
2	948,414	948,434	39,6873	42,1873	312,837	mutación

b) Identificación de las diferencias entre la referencia y la muestra utilizando los datos de MS/MS

10

Se comprobó la identificación de las diferencias encontradas utilizando el procedimiento descrito en el primer párrafo anterior de todo el grupo de picos de isótopos por ser típica de los péptidos. A continuación, se comprobó si se ha seleccionado la señal de m/z respectiva para la generación de la fragmentación de MS/MS y si se identificó por medio de la búsqueda tolerante a error de Mascot (Mascot ETS). Cada mutación (variante) en la secuencia de aminoácidos tentativa identificada por Mascot ETS se comprobó y confirmó manualmente utilizando los espectros iónicos del fragmento de MS/MS obtenidos.

15

Alternativamente, si los datos de MS/MS se han registrado y Mascot ETS no propuso una secuencia, se aplicó de forma manual o mediante el uso de software una secuenciación *de novo*.

20

c) Cuantificación de variantes de secuencia identificadas

25

La secuencia (variante) de aminoácidos mutante identificada se cuantificó en el nivel del fragmento de secuencia de aminoácidos (tríptico) que contiene la mutación (variante) y en relación con el péptido original, no mutado en la misma muestra (véase la Figura 12 y la Figura 13). Dos cromatogramas de iones extraídos (CIEs) se generaron a partir de los datos de LC-MS de la muestra, uno para el péptido mutante (variante) y uno para el péptido nativo. Los cromatogramas de iones extraídos (CIEs) incluyen todos los estados de carga y todos los picos isotópicos del péptido respectivo. Los picos generados por los respectivos CEIs se integraron utilizando el software del instrumento (XCalibur), y las áreas se calcularon por la presente de acuerdo con la fórmula mostrada en el Ejemplo 1.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Método para la determinación de variantes de secuencia de polipéptidos

35

<130> 26601 WO

<150> EP10001645.0

<151> 18-02-2010

40

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

45

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

50

<400> 1

ES 2 609 669 T3

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Gly Val Phe
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Lys Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
 50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80

Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Val Asn Leu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Ile Val Ser Ser
 115

<210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 2

5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

10

ES 2 609 669 T3

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gly Asn Ile His Gly Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Ala Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Leu Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

5 <210> 3
<211> 117
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
10 <400> 3

ES 2 609 669 T3

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Gly Ile Phe
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Lys Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
 50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80

Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Val Asn Leu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Ile Val Ser Ser
 115

- 5
- <210> 4
 - <211> 108
 - <212> PRT
 - <213> *Mus musculus*
 - <400> 4

ES 2 609 669 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Gly Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Leu Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

- <210> 5
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 5

5

ES 2 609 669 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Gly Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Leu Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 7
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

10

ES 2 609 669 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

330

ES 2 609 669 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

ES 2 609 669 T3

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 9

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

10

<210> 10

ES 2 609 669 T3

<211> 105
 <212> PRT
 <213> Humano

5 <400> 10

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un polipéptido con una secuencia de aminoácidos mutante, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- a) proporción de al menos dos muestras del polipéptido,
- b) incubación de cada una de las muestras con la misma proteasa,
- c) análisis de las muestras incubadas por un análisis de datos bidimensional utilizando una combinación de separación por cromatografía líquida en fase inversa y un análisis por espectrometría de masas y/o un análisis MS/MS,
- d) definición de la serie de datos obtenida con una muestra de la etapa c) como muestra de referencia y comparación de las series de datos obtenidas con las otras muestras de la etapa c) con la serie de datos de la muestra de referencia, por lo que cada diferencia de secuencia de aminoácidos con una relación de más de 3 de la intensidad de señal de espectro de la masa de muestra a la intensidad de señal de espectro de la masa de referencia es una mutación en la secuencia de aminoácidos del polipéptido y determina con ello un polipéptido con una secuencia de aminoácidos mutante,

en el que el ancho del marco m/z es igual o superior a 1,6 para la comparación de patrones.

2. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una etapa:

- e) determinación de la identidad y la posición de las mutaciones en los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos por análisis MS/MS.

3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que se proporciona una muestra adicional que comprende el polipéptido adicionado en el polipéptido con una mutación de secuencia de aminoácidos conocida y la muestra adicional se incuba, se analiza y se compara además de las muestras proporcionadas.

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la preparación de la muestra se realiza a un valor de pH inferior a pH 8,0 y a una temperatura inferior a 40 °C.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que las muestras se proporcionan en un tampón tris(hidroximetil)aminometano.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la incubación de las muestras con una proteasa es una escisión del polipéptido por la proteasa en fragmentos de la secuencia de aminoácidos de 3 a 60 restos de aminoácidos de longitud.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la comparación en la etapa d) se realiza con los datos de uno, una parte o la totalidad de los estados de carga de MS.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el polipéptido es una inmunoglobulina, un fragmento de inmunoglobulina o un conjugado de inmunoglobulina.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que las muestras se incuban durante 16 horas a 18 horas con la proteasa, y después se añade ácido fórmico o ácido trifluoroacético.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que las muestras se incuban durante 4 horas con la proteasa, y después se añade ácido fórmico o ácido trifluoroacético.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la comparación comprende la superposición del cromatograma de iones totales con espectrometría de masas (MS-TIC) de la muestra de referencia y cada una de las otras muestras a analizar,

por lo que se calcula la relación de intensidad de todas las masas superpuestas y alineadas, de modo que los picos con una relación superior a 10 se evalúan como mutación de secuencia de aminoácidos.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la comparación comprende además la comparación del patrón peptídico de fragmentos proteolíticos de traducción de ADN de la secuencia de aminoácidos teórica y del cromatograma de iones totales con espectrometría de masas (MS-TIC) de la muestra a analizar, y las mutaciones en la secuencia de aminoácidos se identifican añadiendo, o restando, respectivamente, de cada masa teórica calculada de la secuencia de aminoácidos teórica, las diferencias de masas resultantes de una mutación, delección o inserción de ácido nucleico en un triplete de bases (codón) con un cambio de aminoácidos.

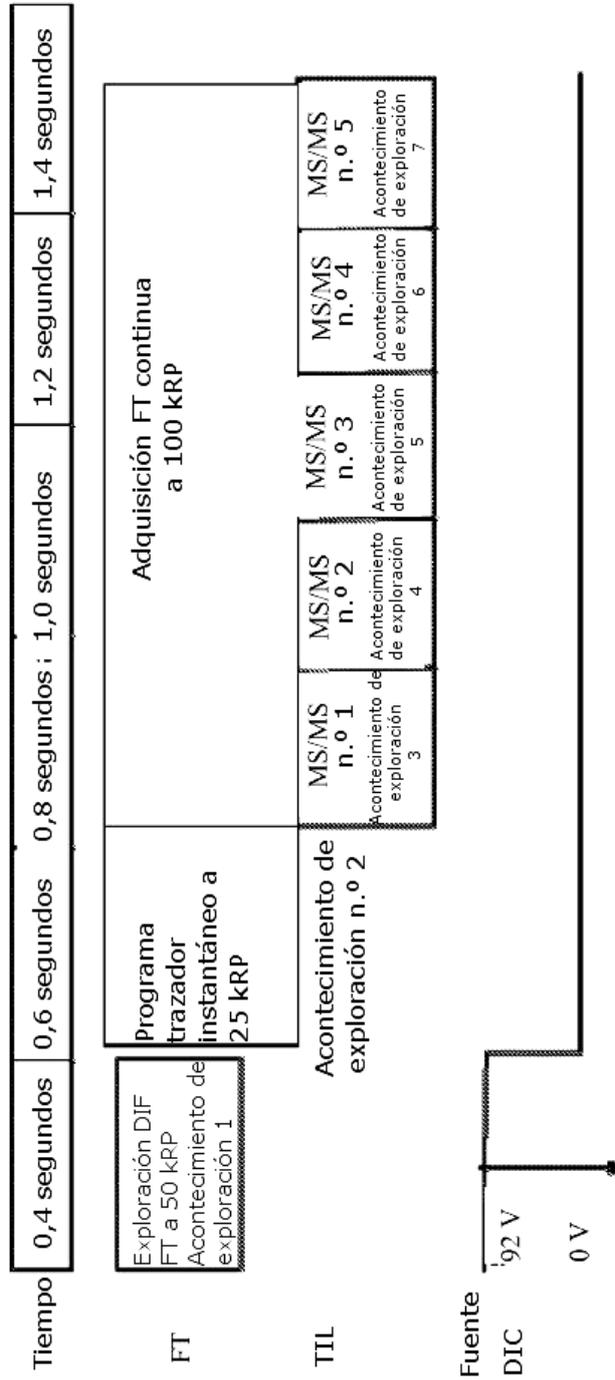


Fig. 1

Fig. 2

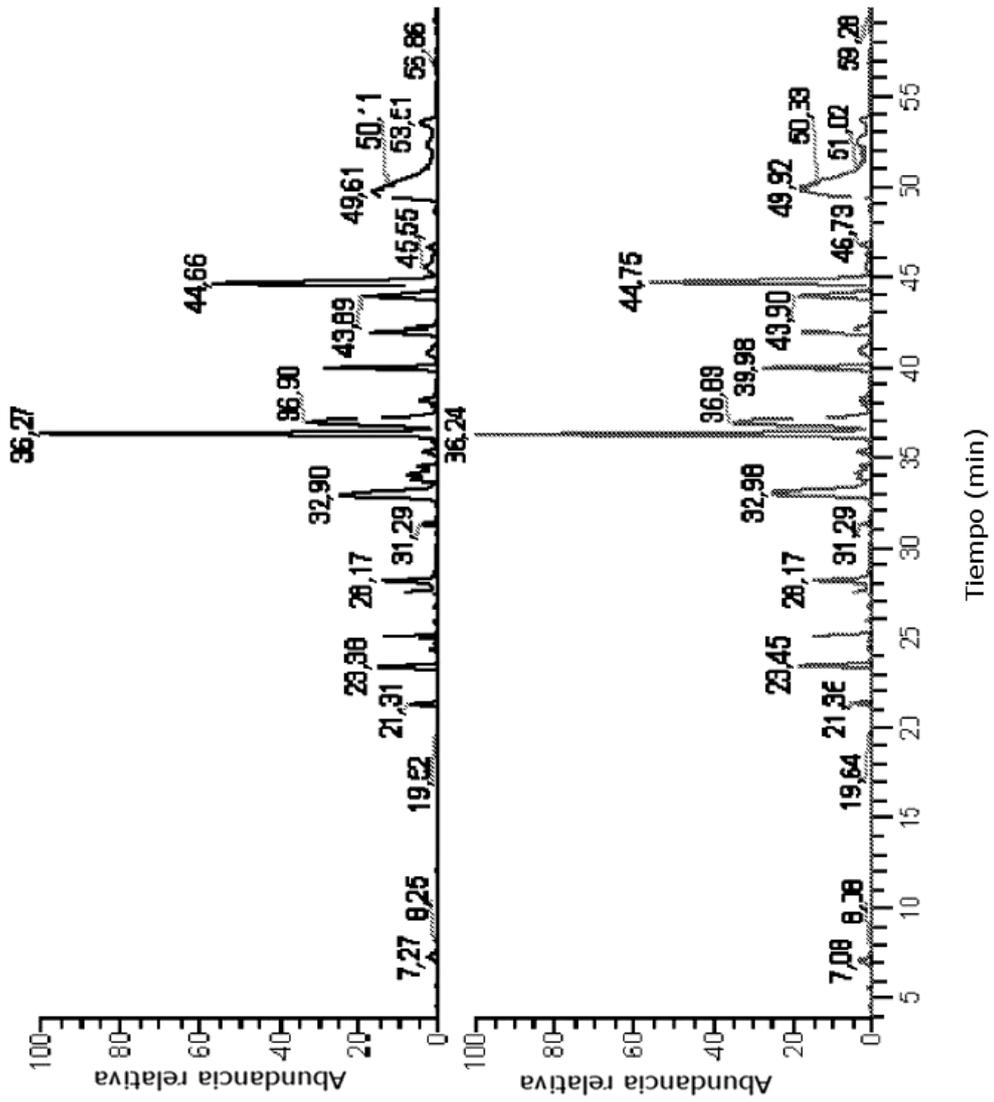
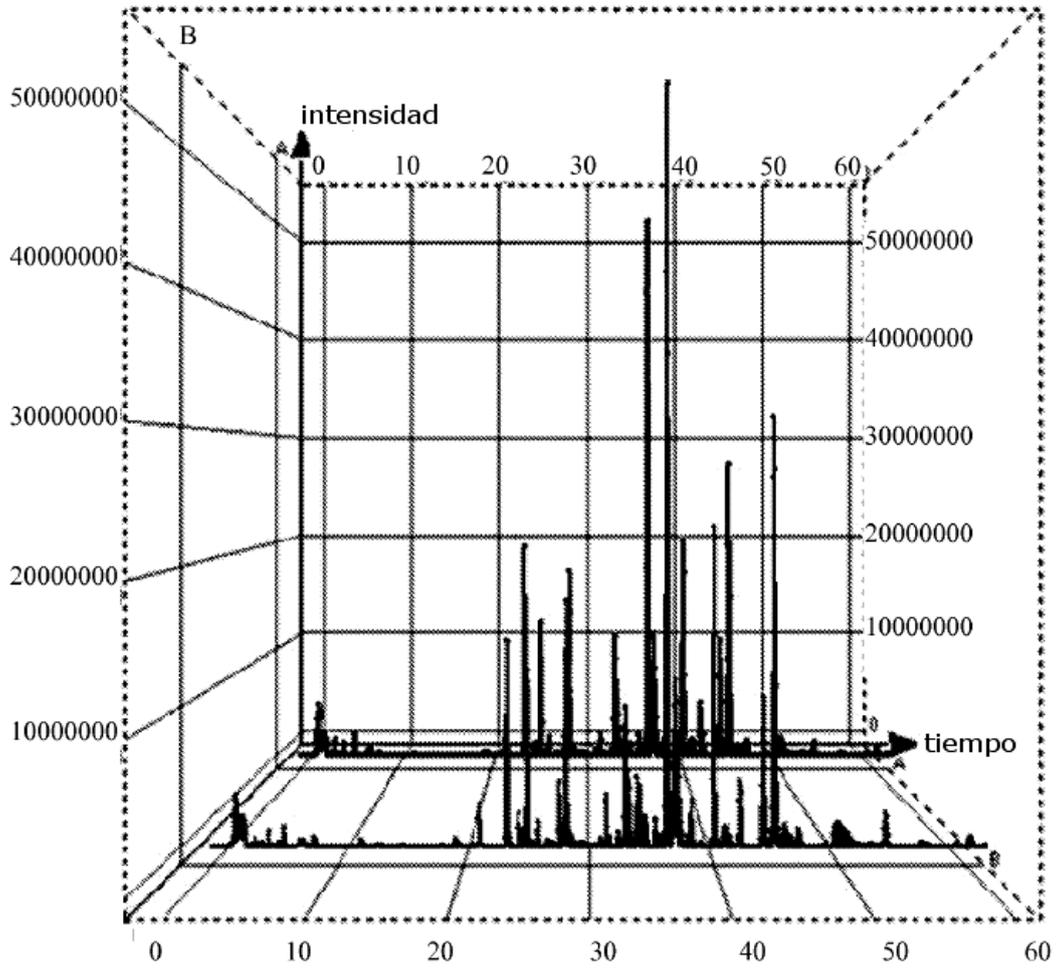


Fig. 3



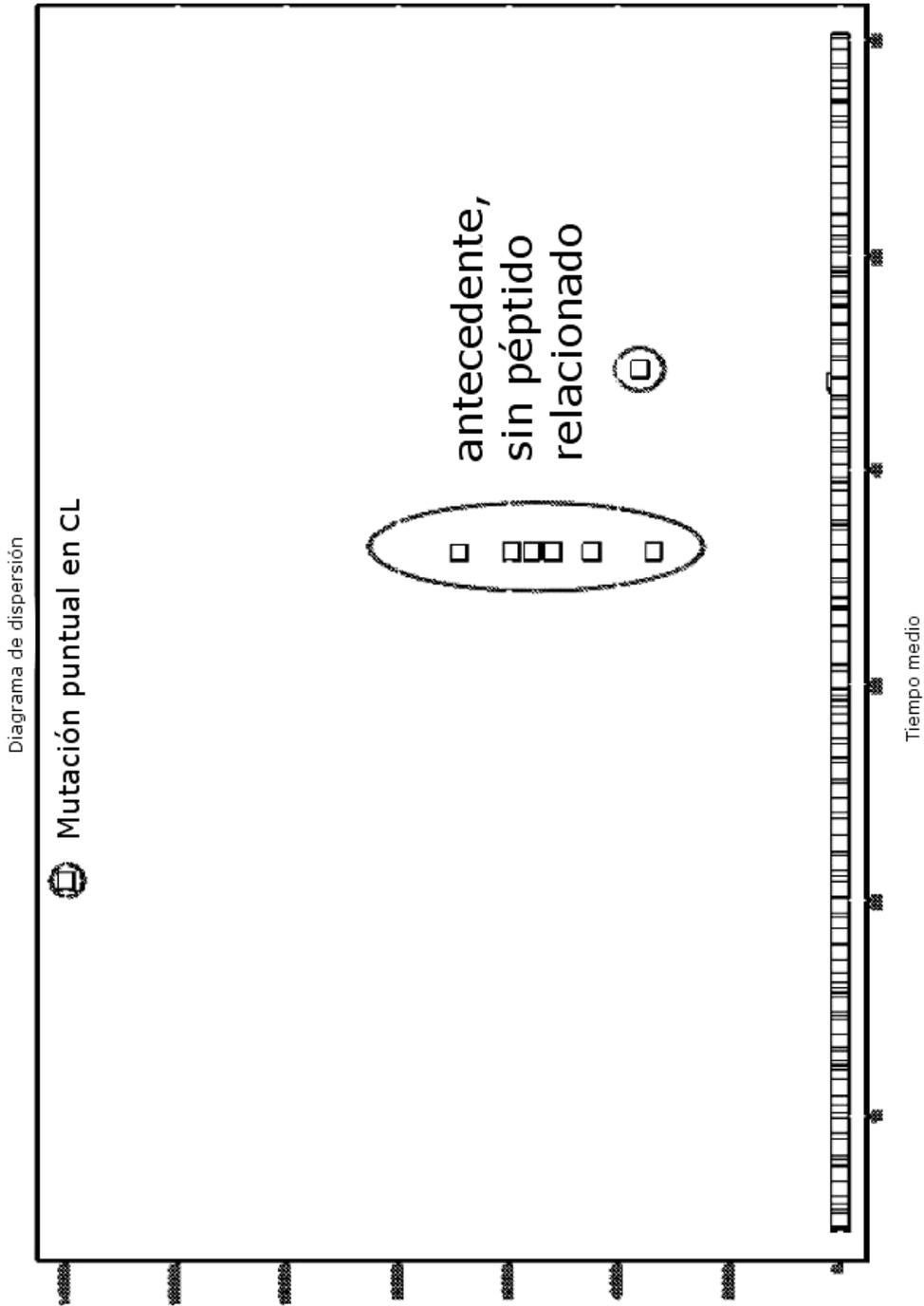


Fig. 4

Fig. 5

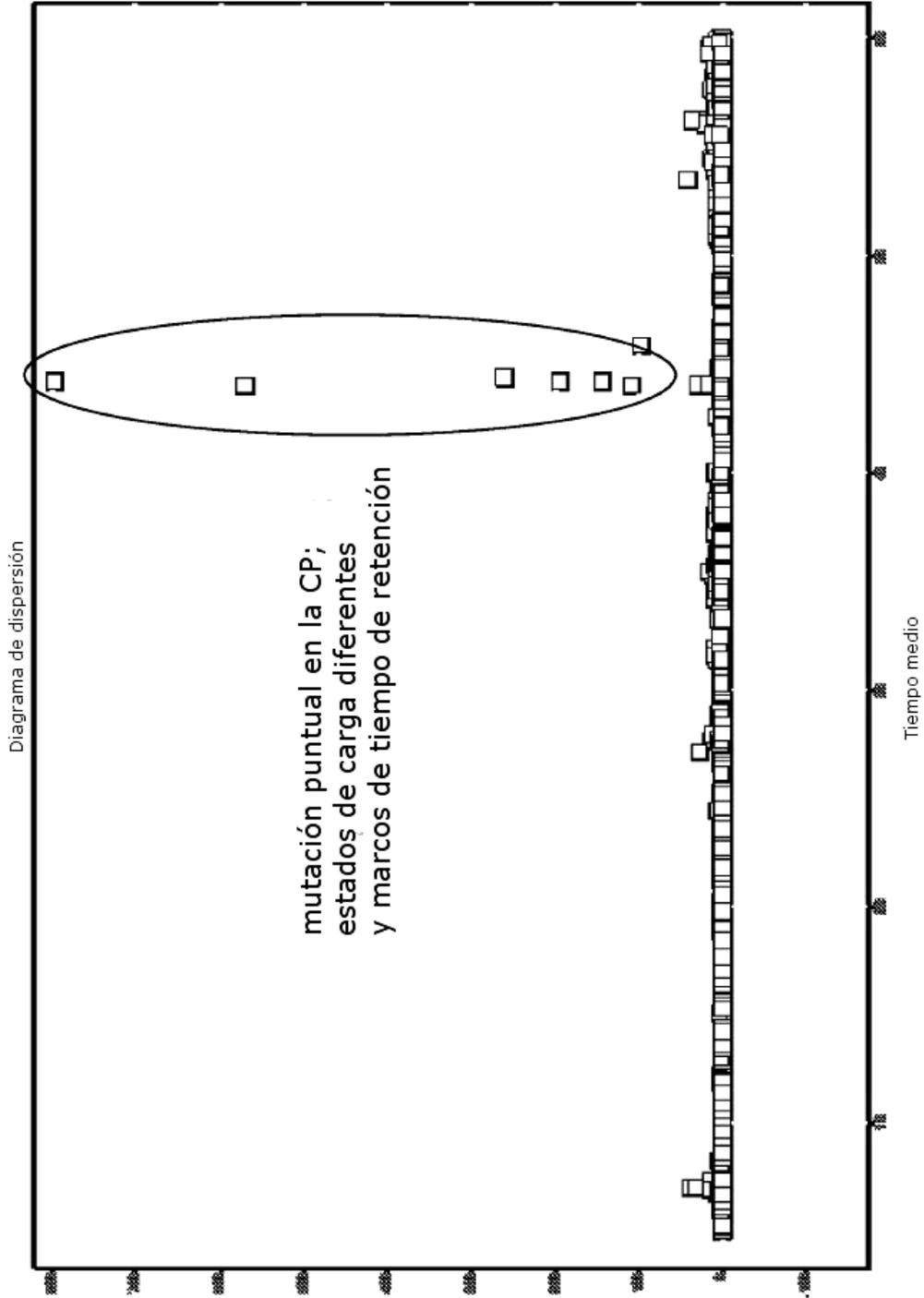


Fig. 6

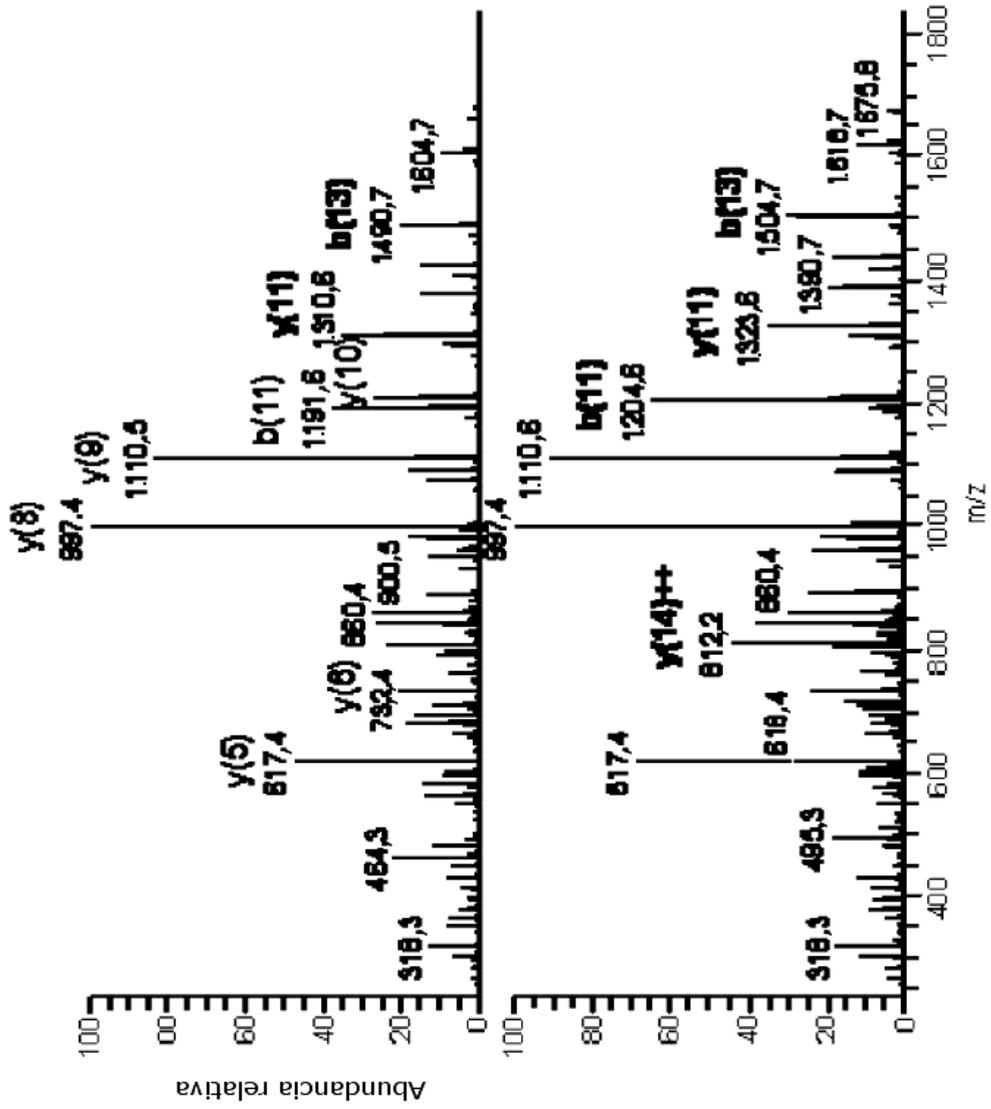
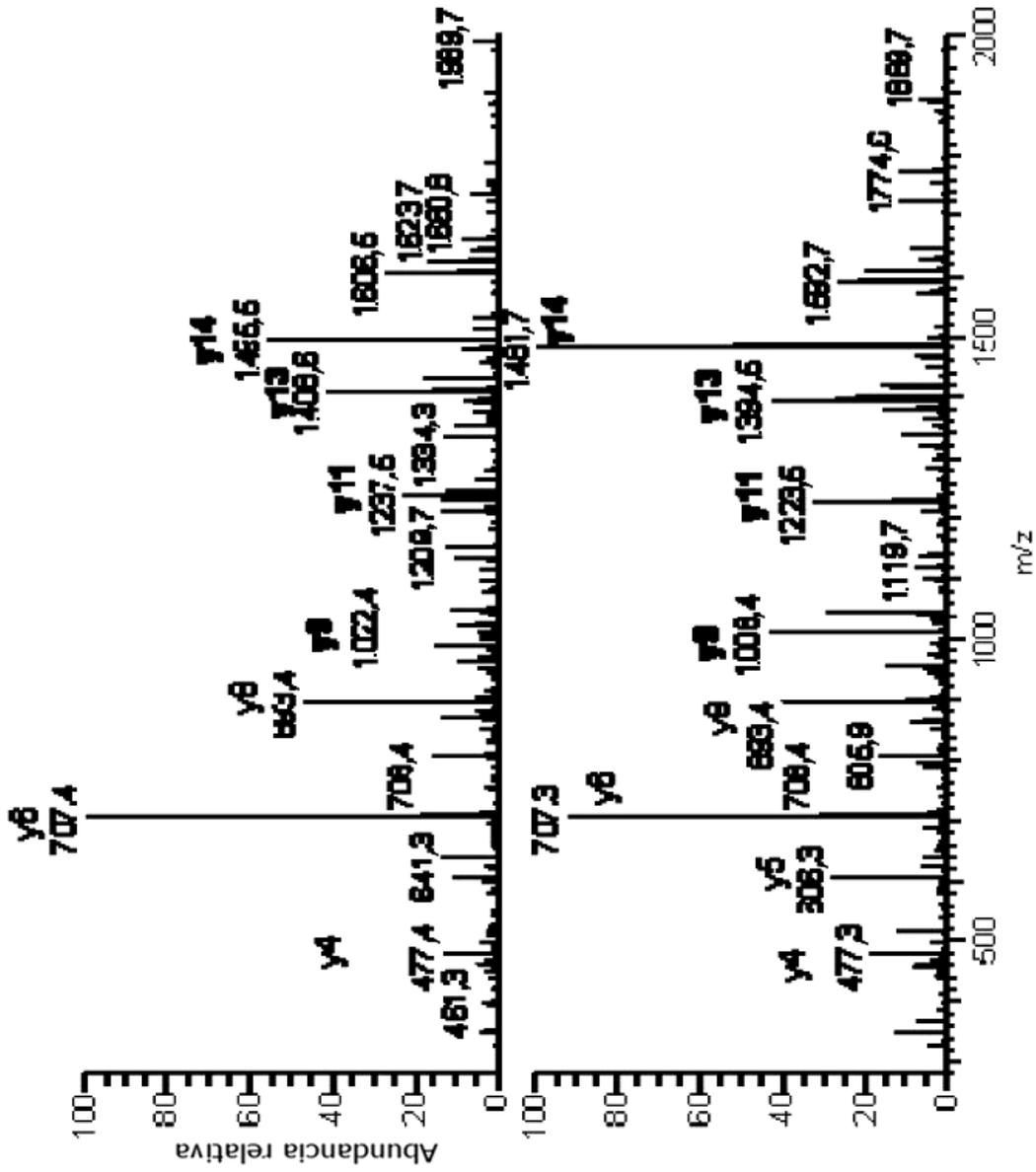


Fig. 7



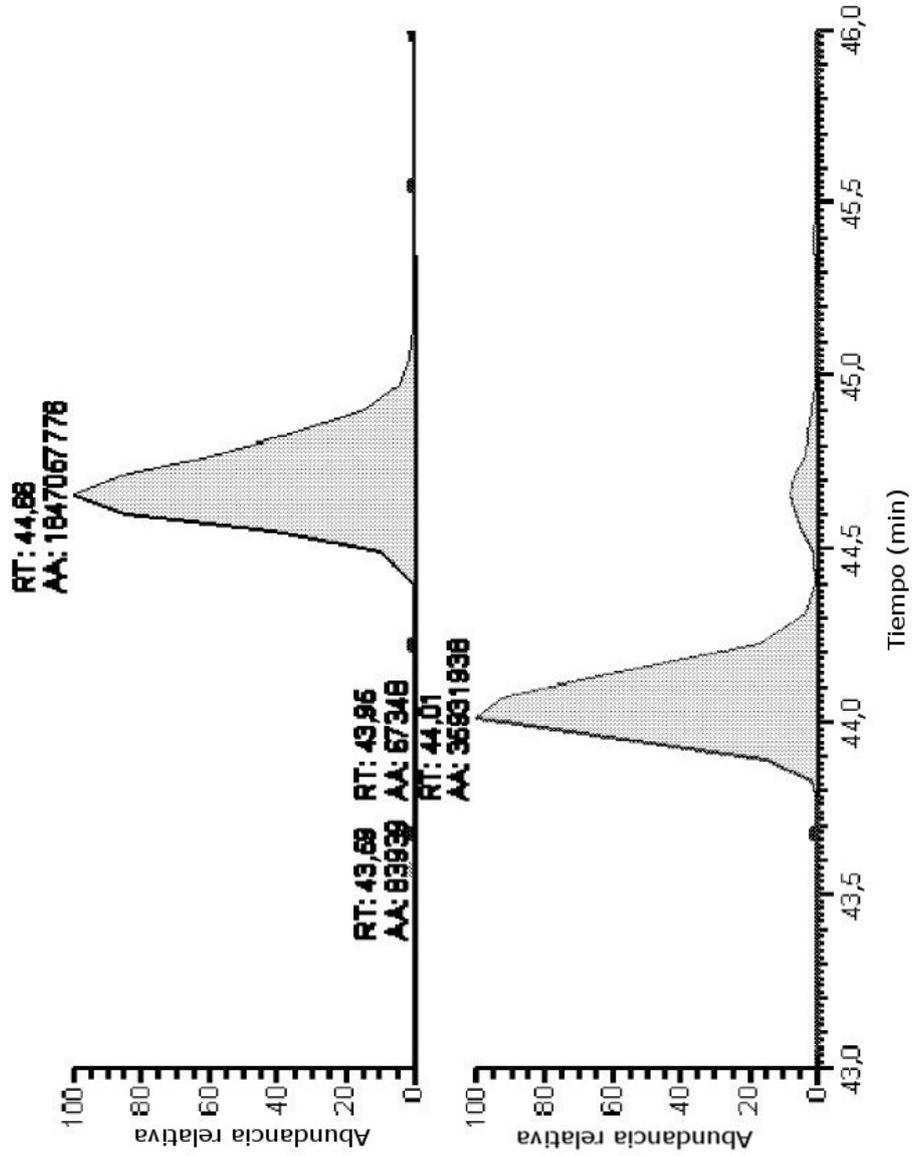


Fig. 8

Fig. 9

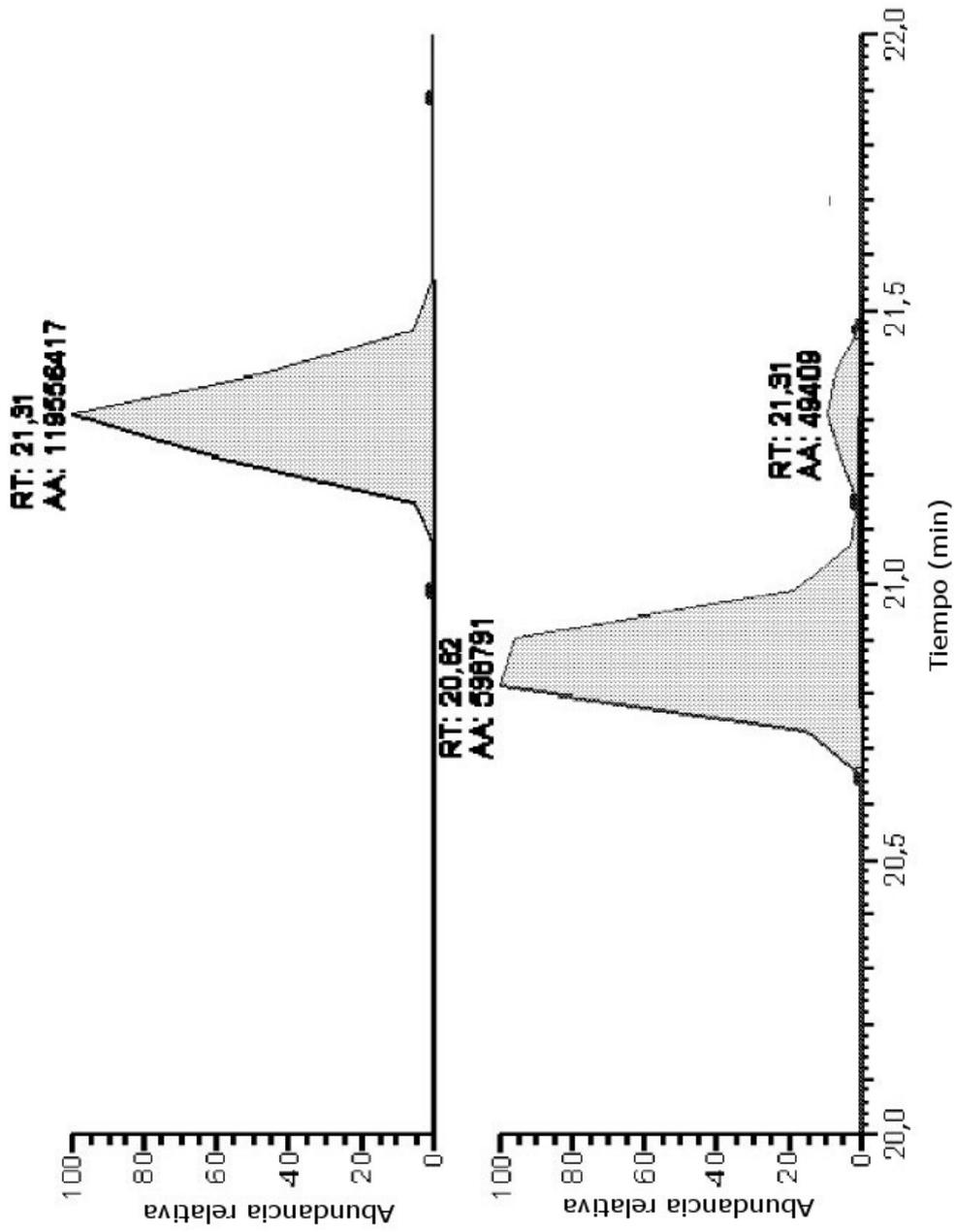


Fig. 10

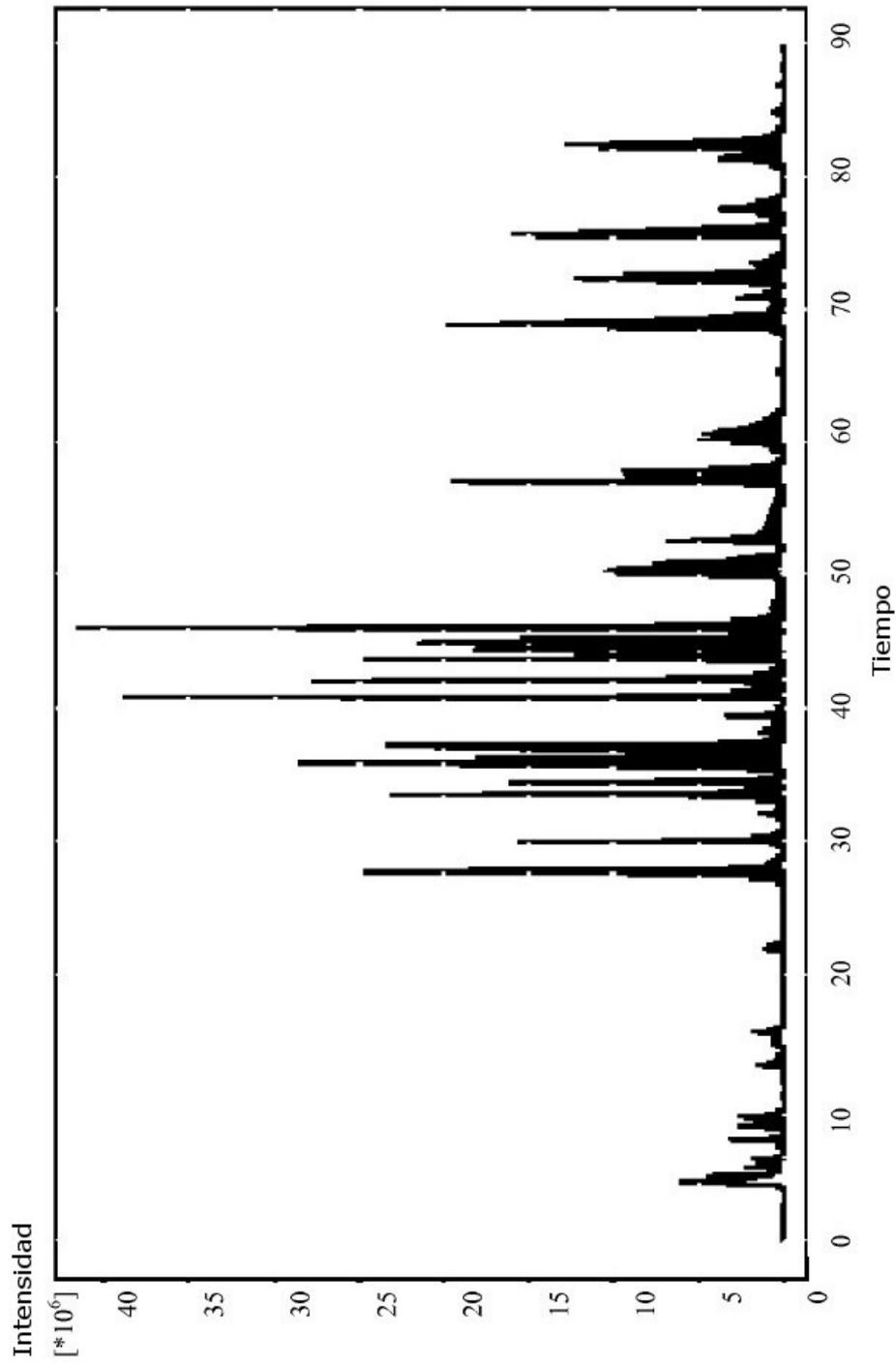


Fig. 11

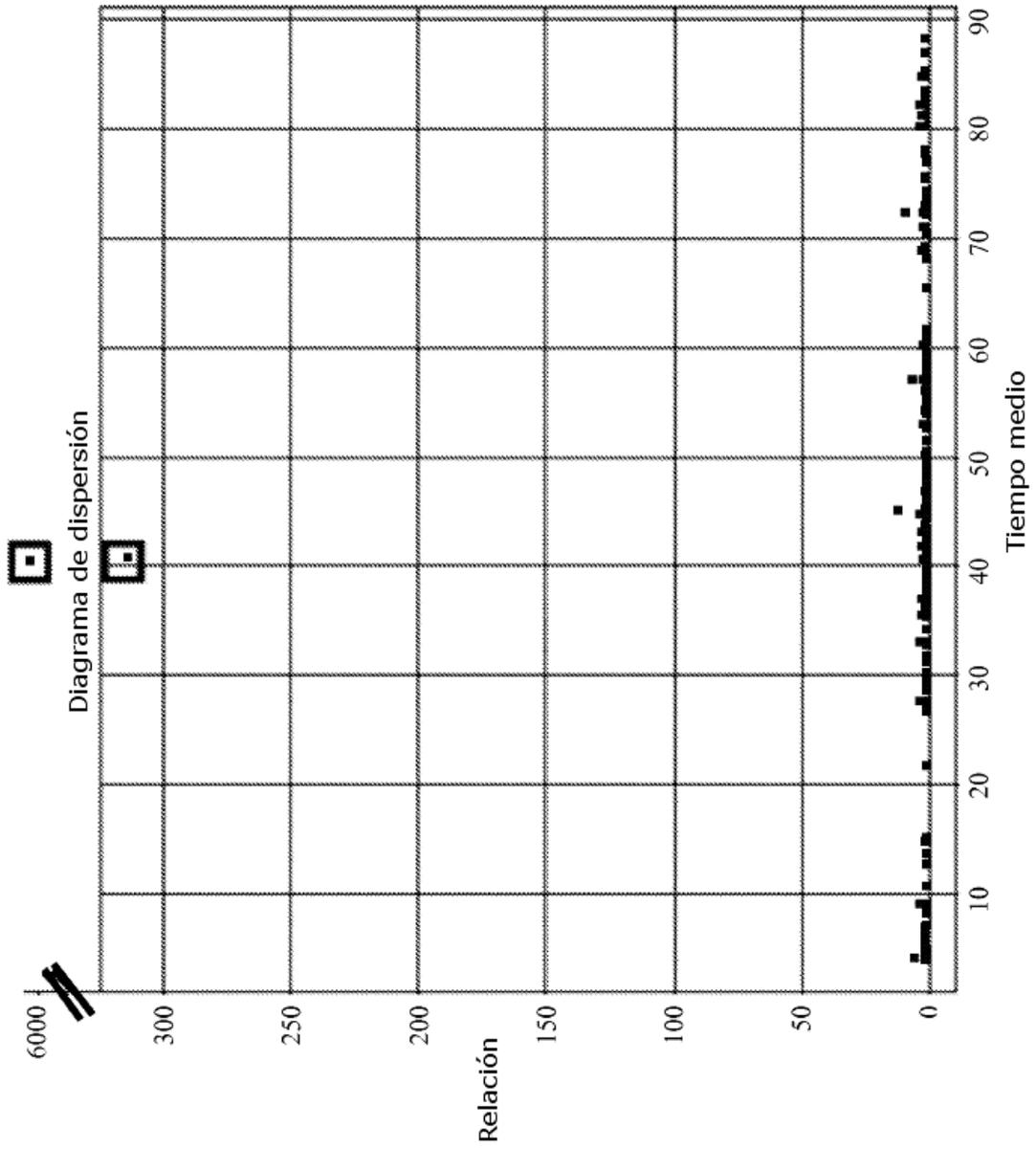


Fig. 12

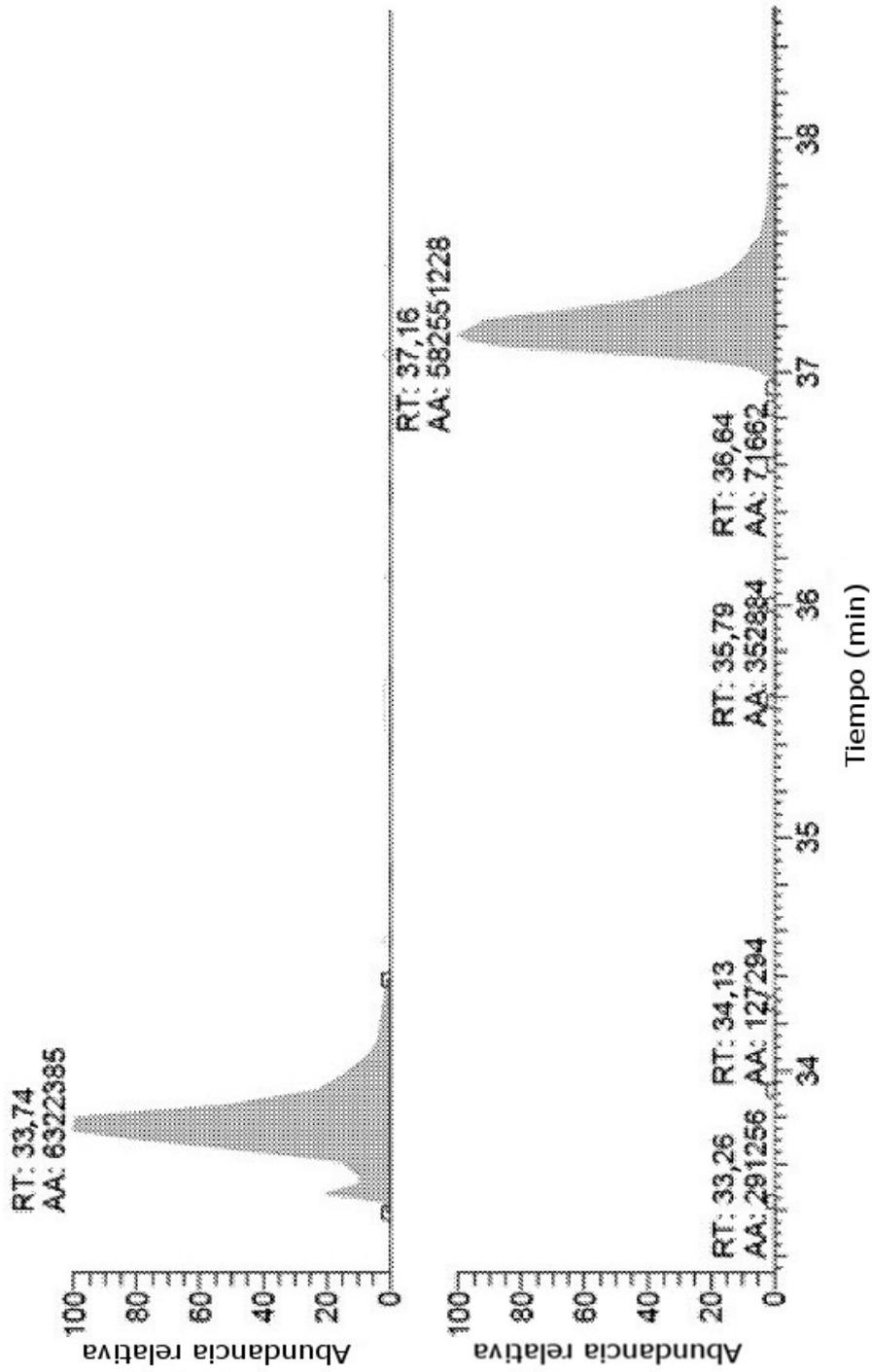


Fig. 13

