

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 147**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/12**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2013 PCT/JP2013/074292**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15033479**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2013 E 13893016 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 3023777**

54 Título: **Método para preparar fragmentos de péptidos, kit para preparar fragmentos de péptidos que se van a emplear en el mismo y método de análisis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.01.2018**

73 Titular/es:

**SHIMADZU CORPORATION (100.0%)  
No. 1 Nishinokyo-kuwabaracho Nakagyo-ku  
Kyoto-shi, Kyoto-fu 604-8511, JP**

72 Inventor/es:

**SHIMADA, TAKASHI;  
FUKAO, NORIKO;  
AOKI, CHIKAGE y  
SATO, TAKA-AKI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 649 147 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 preparar fragmentos de péptidos, kit para preparar fragmentos de péptidos que se van a emplear en el mismo y método de análisis

5 La presente invención se refiere a un método para preparar fragmentos de péptidos por medio de proteolizar de modo selectivo de sitio una proteína, tal como un anticuerpo, empleando una proteasa, y un kit para preparar fragmentos de péptidos que se van a emplear en él. Además, la presente invención se refiere a un método para analizar fragmentos de péptidos, que comprende la preparación de dichos fragmentos mediante el método, y en análisis mediante espectrometría de masas para detectar o cuantificar una proteína.

10 La demanda de fármacos de anticuerpos ha crecido con rapidez y la simple cuantificación de la concentración de un anticuerpo en la sangre ha adquirido importancia en la práctica clínica. Hasta la fecha, la medición precisa de la concentración de un fármaco de anticuerpo en la sangre después de la administración no se ha considerado importante. Sin embargo, las mediciones de la concentración de un anticuerpo en la sangre han adquirido un carácter fundamental en los ensayos clínicos, o similares, de fármacos de anticuerpos, puesto que se ha descubierto que, en ensayos clínicos realizados para expandir la aplicación del trastuzumab (nombre comercial: Herceptin) al  
15 cáncer gástrico, se observaron diferencias significativas en la concentración del trastuzumab en sangre y la supervivencia global. Por ejemplo, también se requiere la identificación de un fármaco de anticuerpo o la cuantificación de la concentración de un fármaco de anticuerpo en sangre para el control de calidad, tal como la determinación farmacocinética, la confirmación de la identidad con fármacos originales en ensayos clínicos para fármacos genéricos, o similares.

20 El ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay", ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) que emplea una reacción de antígeno-anticuerpo resulta excelente en especificidad y cuantitabilidad y, por tanto, se emplea mucho en ensayos clínicos o similares, por ejemplo, en la detección y la cuantificación de un antígeno o un anticuerpo en sangre. Sin embargo, el ELISA es un método previsto para detectar una única proteína (antígeno o anticuerpo) y, por tanto, no puede detectar muchas proteínas diferentes al mismo tiempo. Para detectar muchas proteínas  
25 mediante ELISA, es necesario preparar un anticuerpo específico para cada diana de detección y ajustar las condiciones para medir la concentración del anticuerpo específico, lo cual requiere mucho tiempo y coste. Además, el ELISA emplea una reacción de antígeno-anticuerpo y, por tanto, se sabe que presenta un problema, que consiste en que la reactividad cruzada con un fármaco o metabolito coadministrado puede influir en el resultado de una medición, y así es difícil aplicar ELISA a algunos fármacos de anticuerpos para analizar un espécimen conservado o similar.  
30

Por esta razón, ha surgido una demanda para el desarrollo de un método analítico generalmente aplicable a diversos anticuerpos. Con el desarrollo de la proteómica, se ha desarrollado una técnica por la cual proteínas pueden detectarse y cuantificarse a fondo mediante espectrometría de masas. En años recientes, también ha resultado posible el análisis de una macromolécula, tal como un anticuerpo. En la espectrometría de masas, una  
35 molécula que se va a medir debe ionizarse. Por tanto, una macromolécula, tal como un anticuerpo, a menudo resulta difícil de analizar directamente mediante la espectrometría de masas. Por esta razón, se adopta un método en el que una proteína se proteoliza (se fragmenta) mediante digestión con una proteasa, de entre los fragmentos de péptidos se selecciona un fragmento de péptido que tiene una secuencia de aminoácidos específica de la proteína que se va a analizar, y este fragmento de péptido seleccionado se detecta y se cuantifica mediante un espectrómetro de masas. Para mejorar la eficacia de la digestión, la digestión con la proteasa en general se realiza después de desnaturalizar una proteína sustrato en una disolución de urea o guanidina a alta concentración.

Cuando una proteína, tal como un anticuerpo, se fragmenta mediante una digestión con proteasas para realizar una espectrometría de masas, resulta importante detectar selectivamente un fragmento de péptido sujeto. Sin embargo, en algunos casos, es difícil detectar un fragmento de péptido específico derivado de una proteína que se va a  
45 analizar en una muestra biológica que contiene una amplia diversidad de impurezas. De modo más específico, una muestra biológica, tal como sangre, contiene una amplia diversidad de impurezas y, por tanto, cuando se añade una proteasa a una muestra biológica, las proteínas derivadas de las impurezas también se someten a la digestión con la proteasa, de modo que produce un número enorme de fragmentos de péptidos. Para detectar y cuantificar selectivamente, dentro de estos fragmentos de péptidos, un fragmento de péptido diana derivado de una diana de  
50 detección (por ejemplo, un anticuerpo específico), es necesario que los fragmentos de péptidos, por ejemplo, se separen o se concentren antes de someterlos a una espectrometría de masas. Además, cuando un fragmento de péptido, que tiene una secuencia de aminoácidos en común con un fragmento de péptido derivado de una proteína que se va a detectar, se produce a partir de una proteína que no es una diana de detección, puede aparecer una detección falsa o una reducción en la cuantitabilidad. Por esta razón, la selección de un fragmento de péptido que se  
55 va a detectar tiende a ser más difícil a medida que aumenta el número de fragmentos de péptidos producidos a partir de una muestra biológica.

A la vista de tal complejidad de una muestra biológica, se ha desarrollado un método en el que una proteína específica en una muestra compleja, tal como una muestra biológica, se cuantifica sometiendo la muestra a un espectrómetro de masas después de una purificación mediante cromatografía líquida ("liquid chromatography", LC),  
60 o mediante espectrometría de masas de múltiples etapas, en la que la ruptura iónica es provocada por la disociación

inducida por colisión ("collision-induced dissociation", CID) o similares, o mediante una combinación de estos ("multiple reaction monitoring", MRM, control de múltiples reacciones). Sin embargo, a medida que una muestra se hace más compleja, es necesario combinar diversos modos de separación, lo cual provoca problemas, de modo que es necesario un aparato experimental de alta precisión y mucho tiempo para ajustar las condiciones analíticas.

5 Además, aunque se emplee una muestra purificada, se producen una serie de fragmentos de péptidos por la digestión con proteasas a partir de una macroproteína, tal como un anticuerpo. Por tanto, un fragmento de péptido que tiene una secuencia de aminoácidos específica para una diana de detección tiende a ser difícil de detectar selectivamente y cuantificar en los fragmentos de péptidos producidos. A la vista de estos problemas, se ha desarrollado un método en el que una proteína que se va a analizar se somete a una proteólisis con proteasas selectiva de sitio para reducir el número (de tipos) de fragmentos de péptidos en una muestra para mejorar la precisión del análisis y simplificar el proceso de análisis. Por ejemplo, el documento de patente 1 propone un método en el que un anticuerpo se somete a una digestión con pepsina para producir un fragmento  $F(ab')_2$ , y después el fragmento  $F(ab')_2$  posteriormente se digiere con una proteasa, tal como tripsina, para producir fragmentos de péptidos que contienen la región determinante de la complementariedad ("complementarity determining region", CDR) del anticuerpo, y los fragmentos de péptidos que contienen CDR se detectan y se cuantifican mediante espectrometría de masas.

A continuación se describirá la estructura de un anticuerpo. Todos los anticuerpos presentan dos cadenas pesadas (cadenas H) y dos cadenas ligeras (cadenas L). Una cadena ligera y una cadena pesada están unidas a través de un enlace disulfuro (S-S) para formar un heterodímero, y los dos heterodímeros también están unidos a través de dos enlaces disulfuro para formar un heterotetrámero con forma de "Y" (véase la figura 2). Un anticuerpo tiene un dominio Fc ("F", fragmento; "c", cristalizable) que comprende cadenas pesadas y dos dominios Fab ("F", fragmento; "ab", de unión al antígeno ["antigen binding"]) que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, y el dominio Fc y los dominios Fab están unidos entre sí a través de una región bisagra.

El dominio Fc de un anticuerpo fundamentalmente tiene la función de iniciar una reacción después de que el anticuerpo se haya unido a un antígeno (función de efector), y la mayoría de los anticuerpos derivados de la misma especie tienen una secuencia de aminoácidos común en el dominio Fc. Por otra parte, el extremo (en el lado N-terminal) del dominio Fab tiene la función de unirse a un antígeno. La parte N-terminal del dominio Fab cambia diversamente con respecto su secuencia de aminoácidos para ser capaz de unirse a diversos antígenos. Esta región se denomina región variable (región V), y la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada se denominan región VL y región VH, respectivamente. Los dominios Fab y Fc distintos de la región V se denominan región constante (región C) que varía poco con respecto a la secuencia de aminoácidos. La región constante de la cadena ligera se denomina región CL, y la región constante de la cadena pesada se denomina región CH. La región CH se divide además en tres regiones, región CH1, región CH2 y región CH3. El dominio Fab de la cadena pesada comprende la región VH y la región CH1, y el dominio Fc de la cadena pesada comprende CH2 y CH3. La región bisagra se localiza entre CH1 y CH2.

La especificidad (es decir, la capacidad de unión específica a un antígeno) de un anticuerpo se determina mediante la combinación de las secuencias de aminoácidos de la región V. La cadena ligera y la cadena pesada tienen, cada una, regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en la región V del dominio Fab. La CDR también se denomina región hipervariable y varía con respecto a la secuencia de aminoácidos dependiendo del tipo de anticuerpo. Existen 3 CDR en cada cadena pesada y ligera de un anticuerpo (6 tipos de CDR en total), que crean la diversidad que permite que el anticuerpo se una a diversos antígenos. En otras palabras, las CDR son regiones que caracterizan un anticuerpo y, por tanto, un anticuerpo puede identificarse identificando las secuencias de aminoácidos de sus CDR.

Tal como se describió anteriormente, los dominios Fab y el dominio Fc de un anticuerpo están unidos a través de una región bisagra. La papaína, que es un tipo de proteasa, proteoliza la región bisagra y, por tanto, la digestión con papaína de un anticuerpo produce dos dominios Fab y un dominio Fc. Además, la pepsina, que es un tipo de proteasa, proteoliza uno de los dos enlaces disulfuro, es decir, el enlace disulfuro del lado del dominio Fc (lado C-terminal) de la región bisagra y, por tanto, la digestión con pepsina produce un dominio  $F(ab')_2$  que tiene dos dominios Fab unidos entre sí y muchos fragmentos del dominio Fc.

En el método descrito en el documento de patente 1, se produce un dominio Fab o un dominio  $F(ab')_2$  por la digestión con pepsina o la digestión con papaína, y el dominio Fab o el dominio  $F(ab')_2$  se somete a una proteólisis con proteasas selectiva de sitio. Este método puede reducir el número de péptidos producidos por la proteólisis con proteasas y, por tanto, puede producir con eficacia péptidos que contienen CDR, lo cual simplifica la detección y la cuantificación de un anticuerpo mediante espectrometría de masas. Además, el documento de patente 2 indica que el uso combinado de pepsina o papaína y un ion específico mejora la eficacia de la proteólisis con dicha proteasa.

Está disponible en el mercado un kit de purificación, o similar, que presenta una proteasa optimizada para purificar el dominio Fab de un anticuerpo. Sin embargo, en el método descrito en el documento de patente 1, el tratamiento con proteasas debe realizarse después de la purificación del dominio Fab o dominio  $F(ab')_2$  y, por tanto, resulta mucho más largo y costoso preparar una muestra para ser sometida a una espectrometría de masas. Por esta razón, es difícil decir que este método sea un método simple. Además, la eficacia de la proteólisis con proteasas

(fragmentación) varía dependiendo del tipo de proteína sustrato que se va a proteolizar y, por tanto, resulta importante mejorar la eficacia de la proteólisis para simplificar la preparación de una muestra de fragmentos de péptidos que va a someterse a una espectrometría de masas.

5 En años recientes, ha atraído la atención un método en el que la digestión con proteasas se realiza en un microentorno (microrreactor), tal como nanopartículas, puesto que el método puede mejorar la eficacia de la digestión con proteasas. Por ejemplo, el documento que no es patente 1 indica un ejemplo en el que la eficacia de la digestión de la albúmina con tripsina aumenta haciendo pasar una disolución de albúmina a través de una membrana porosa de nailon que presenta tripsina inmovilizada en sus poros. El documento que no es patente 2  
10 indica que una proteína que tiene un peso molecular pequeño puede someterse selectivamente a una digestión con tripsina empleando sílice mesoporosa que presenta tripsina inmovilizada en sus poros. Está previsto que ambos métodos hagan reaccionar a una proteína sustrato en una fase líquida con una proteasa inmovilizada en los poros de un cuerpo poroso como fase sólida. Se considera que la razón por la cual la eficacia de la digestión aumenta inmovilizando una proteasa sobre una fase sólida en un microentorno es debida a una mayor probabilidad de reacción entre la proteína sustrato y la proteasa. En un microentorno local en la interfase entre la fase sólida y la fase líquida, es probable que la proteína esté desnaturalizada, y la solubilidad, la gama de fluctuación de la estructura tridimensional, o similar, se ve perturbada. Por tanto, es probable que aumenten las oportunidades de contacto entre la proteína sustrato y la proteasa para aumentar la probabilidad de reacción.

Documento de patente 1: WO 2008/079914

Documento de patente 2: JP 2011-130749 A

20 Documento que no es patente 1: Fei Xu *et al.*, Anal. Chem., 2010, 82, 10045-10051

Documento que no es patente 2: Qianhao Min *et al.*, Chem. Commun., 2010, 46(33), 6144-6146

El método descrito en el documento que no es patente 2 puede lograr la digestión con proteasas selectiva de una proteína que tiene un peso molecular pequeño, pero no puede aplicarse a la digestión selectiva de una proteína grande, tal como un anticuerpo. Además, no se ha desarrollado ningún método para realizar la proteólisis con proteasas selectiva de sitio empleando un microrreactor como el descrito en el documento que no es patente 1 o 2.  
25

Tal como se describió anteriormente, para simplificar la detección y la cuantificación de una proteína mediante espectrometría de masas, la proteína que se va a analizar debe proteolizarse de modo selectivo de sitio para producir, de forma eficaz, un fragmento de péptido específico de la proteína que se va a analizar y para reducir la cantidad de otros fragmentos de péptidos producidos. Por ejemplo, para detectar y analizar cuantitativamente un anticuerpo, el dominio Fab, en especial la región V del dominio Fab, debe someterse a una proteólisis con proteasas selectiva de sitio para suprimir la proteólisis del dominio Fc.  
30

Los inventores han realizado un estudio a fondo para descubrir que la inmovilización de una proteína sustrato, tal como un anticuerpo, y de una proteasa sobre fases sólidas permite lograr una proteólisis con proteasas selectiva de sitio de la proteína sustrato. Este descubrimiento ha conducido a la presente invención.

35 La presente invención se refiere a un método para preparar fragmentos de péptidos por medio de proteolizar una proteína con una proteasa. El método de la presente invención incluye una etapa de proteolizar una proteína sustrato con una proteasa poniendo en contacto entre sí un cuerpo poroso, en el que una proteína sustrato que se va a proteolizar está inmovilizada en sus poros, y micropartículas que presentan una proteasa inmovilizada sobre su superficie, en un líquido (etapa de proteólisis). El cuerpo poroso sobre el cual la proteína sustrato que se va a proteolizar está inmovilizada en sus poros se obtiene mediante una etapa de inmovilizar una proteína sustrato que se va a proteolizar en los poros de un cuerpo poroso (etapa de inmovilización del sustrato). En la presente invención, un diámetro promedio de partícula de las micropartículas es preferiblemente mayor que un diámetro promedio de poro del cuerpo poroso.  
40

45 Cuando el diámetro de partícula de las micropartículas es mayor que el diámetro promedio de poro del cuerpo poroso, la proteasa inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas puede acceder a las partes someras de los poros y la vecindad del cuerpo poroso (la interfase entre el cuerpo poroso y la fase líquida y su vecindad), pero no puede acceder a las partes profundas de los poros. De esta forma, la región accesible de la proteína está físicamente (espacialmente) limitada y, por tanto, la proteasa accede selectivamente a un sitio específico de la proteína sustrato inmovilizada en los poros del cuerpo poroso. Esto hace posible lograr una proteólisis (fragmentación) con proteasas selectiva de sitio de la proteína sustrato.  
50

En la presente invención, una región predeterminada de la proteína sustrato preferiblemente se inmoviliza sobre el cuerpo poroso. En esta realización, la región inmovilizada sobre el cuerpo poroso está localizada en las partes profundas de los poros, de modo que una región diferente de la región inmovilizada está localizada cerca de las partes someras de los poros. Cuando una región diferente del sitio de proteólisis selectiva de la proteína sustrato, es decir, una región que se prefiere que no se someta a una proteólisis con proteasas, está inmovilizada sobre el cuerpo poroso, la proteasa inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas accede al sitio de proteólisis selectiva de la proteína sustrato localizado cerca de las partes someras de los poros, de modo que se realiza la  
55

proteolisis con la proteasa. Esto permite lograr una proteolisis con proteasas selectiva de sitio en un sitio deseado de la proteína sustrato.

Una molécula conectora capaz de realizar una interacción específica de sitio con una proteína sustrato preferiblemente se inmoviliza en los poros del cuerpo poroso. La proteína sustrato se inmoviliza en los poros del cuerpo poroso preferiblemente a través de la molécula conectora. Los ejemplos de moléculas conectoras empleadas cuando la proteína sustrato es un anticuerpo incluyen proteína G y proteína A. Esta molécula conectora se une de modo específico de sitio con la región Fc del anticuerpo y, por tanto, la región Fc del anticuerpo se inmoviliza sobre el cuerpo poroso, de modo que la región Fab del anticuerpo se localiza cerca de las partes someras de los poros. Según esta realización, la región Fab del anticuerpo puede someterse a una proteolisis con proteasas selectiva.

Cuando la molécula conectora está inmovilizada en los poros del cuerpo poroso, una molécula, en la que la molécula conectora se une a la proteína sustrato, preferiblemente tiene un tamaño de 0,5 veces a 1,5 veces el diámetro promedio de poro del cuerpo poroso. Este ajuste del tamaño molecular permite aumentar la probabilidad de acceso de la proteasa inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas al sitio de ruptura selectiva de la proteína sustrato, mejorando con ello la selectividad de sitio de la proteolisis con proteasas.

Se prefiere que la superficie de las micropartículas se modifique con una molécula espaciador capaz de unirse con la proteasa, y la proteasa se inmoviliza sobre la superficie de las micropartículas a través de la molécula espaciadora. La inmovilización de la proteasa a través de la molécula espaciador hace posible suprimir el desprendimiento de la proteasa de la superficie de las micropartículas, mejorando con ello la selectividad de sitio de la proteolisis con proteasas. Además, el ajuste del tamaño molecular del espaciador permite a la proteasa acceder selectivamente a una posición deseada en la proteína sustrato para mejorar la selectividad de sitio.

En la presente invención, la proteasa que se va a inmovilizar sobre la superficie de las micropartículas es preferiblemente tripsina o una combinación de tripsina y otra proteasa. Cuando la proteína sustrato es un anticuerpo, la tripsina se emplea preferiblemente sola o en una combinación de proteasas. Cuando se emplean proteasas en una combinación, la cantidad de tripsina es preferiblemente 90% o más de la cantidad total de proteasas. En particular, cuando la proteína sustrato es un anticuerpo, el dominio Fab tiende a someterse a una proteolisis con proteasas selectiva empleando tripsina, de modo que se suprime la proteolisis por proteasas del dominio Fc.

El diámetro promedio de poro del cuerpo poroso es preferiblemente de aproximadamente 30 a 150 nm, y el diámetro promedio de partícula de las micropartículas es preferiblemente de 100 nm o mayor. En particular, cuando la proteína sustrato es un anticuerpo y el diámetro promedio de poro y el diámetro promedio de partícula están dentro de los anteriores intervalos, la región Fab puede proteolizarse de modo selectivo de sitio de una manera más fiable.

La presente invención también se refiere a un kit para la preparación de fragmentos de péptidos empleados para el método anterior. El kit de preparación de fragmentos de péptidos de la presente invención incluye un cuerpo poroso que tiene poros capaces de inmovilizar una proteína sustrato, y micropartículas capaces de inmovilizar una proteasa sobre su superficie. Las micropartículas pueden proporcionarse en un estado en el que la proteasa está inmovilizada sobre su superficie. El cuerpo poroso del kit y una muestra (por ejemplo, un espécimen, tal como sangre) se ponen en contacto entre sí de modo que la sustancia sujeto (una proteína sustrato, tal como un anticuerpo) en la muestra puede inmovilizarse en los poros del cuerpo poroso. La proteína sustrato se somete a una proteolisis con proteasas selectiva de sitio poniendo en contacto entre sí el cuerpo poroso después de la inmovilización de la proteína sustrato, y las micropartículas que presentan la proteasa inmovilizada sobre su superficie, en un líquido.

Los fragmentos de péptidos obtenidos por el método anterior se analizan mediante espectrometría de masas o similar, lo cual permite detectar (identificar) o cuantificar la proteína sustrato. En la presente invención, la proteína sustrato se somete a una proteolisis con proteasas selectiva de sitio y, por tanto, puede reducirse significativamente el número de tipos de fragmentos de péptidos contenidos en una muestra de medición. Por tanto, el ajuste de las condiciones de medición de la espectrometría de masas puede simplificarse y también se espera que la precisión del análisis mejore.

Por ejemplo, cuando la proteína sustrato es un anticuerpo, el método según la presente invención puede lograr una proteolisis con proteasas selectiva de sitio de la región Fab que contiene una región determinante de complementariedad y, por tanto, puede producirse un fragmento de péptido que contiene al menos parte de la secuencia de la región determinante de la complementariedad del anticuerpo, como diana de detección. La región determinante de la complementariedad tiene una secuencia de aminoácidos específica en cada anticuerpo. Por tanto, el anticuerpo puede detectarse o cuantificarse analizando el fragmento de péptido que contiene la secuencia de la región determinante de la complementariedad.

Según la presente invención, una proteína, tal como un anticuerpo, puede someterse a una proteolisis con proteasas selectiva de sitio por medio de un método simple para obtener fragmentos de péptidos. Cuando el método según la presente invención se aplica a un anticuerpo, se suprime la proteolisis de la región Fc del anticuerpo, y la región Fab que contiene la CDR se somete a una proteolisis con proteasas selectiva y, por tanto, la concentración del fragmento de péptido que contiene la secuencia de aminoácidos de CDR, que es importante para la identificación del anticuerpo, en una muestra aumenta.

- El método según la presente invención permite reducir significativamente el número de tipos de péptidos contenidos en una muestra de medición. Por tanto, el ajuste de las condiciones de la espectrometría de masas puede simplificarse y también se espera que la precisión del análisis mejore. También puede cuantificarse la concentración de un fármaco de anticuerpo en sangre analizando los fragmentos de péptido obtenidos. Por tanto, el método según la presente invención también puede aplicarse como método de pretratamiento para un sistema para medir la concentración de un fármaco de anticuerpo en un ensayo preclínico o clínico.
- Además, el método según la presente invención puede aplicarse no solo a fármacos de anticuerpos, sino también a muchas proteínas y, por tanto, puede esperarse que se aplique ampliamente en la industria farmacéutica. Además, también puede esperarse que el método según la presente invención se aplique, por ejemplo, en el campo de la investigación fundamental, tal como en el análisis interactivo de biomoléculas.
- En las figuras:
- La figura 1 es un diagrama conceptual para ilustrar el principio de la proteólisis selectiva de sitio según la presente invención.
- La figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra la estructura de un anticuerpo.
- La figura 3 es un diagrama esquemático de una realización de un kit para preparar fragmentos de péptidos.
- La figura 4 muestra los patrones electroforéticos obtenidos en un experimento para estudiar la proporción cuantitativa de una proteasa.
- La figura 5 muestra los espectros de masas (MALDI-TOFMS) obtenidos en el experimento para estudiar la proporción cuantitativa de una proteasa.
- La figura 6 muestra los espectros de masas (MALDI-TOFMS) obtenidos en un experimento para estudiar el tiempo de proteólisis.
- La figura 7 muestra el resultado del análisis de una base de datos basándose en el resultado de una espectrometría de masas de fragmentos trípticos de trastuzumab.
- La figura 8 muestra un espectro de masas (MALDI-TOFMS) de fragmentos trípticos de trastuzumab.
- La figura 9 muestra cromatogramas del análisis LC-MS de fragmentos trípticos de trastuzumab.
- La figura 10 muestra los espectros de masas (LS-MS) de fragmentos trípticos de trastuzumab.
- Las figuras 11(A) y 11(B) muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de trastuzumab, respectivamente, en las que los fragmentos de péptidos identificados mediante espectrometría de masas en este experimento están subrayados.
- La figura 12 muestra los patrones electroforéticos obtenidos en un experimento para estudiar la proteólisis con proteasas mixta.
- La figura 13 muestra los espectros de masas (MALDI-TOFMS) obtenidos en el experimento para estudiar la proteólisis con proteasas mixta.
- Según un método para preparar fragmentos de péptidos de la presente invención, una proteína sustrato que se va a proteolizar se inmoviliza en poros de un cuerpo poroso, y el cuerpo poroso que presenta la proteína sustrato inmovilizada sobre él se pone en contacto, en un líquido, con micropartículas que presentan una proteasa inmovilizada sobre su superficie. La figura 1 es un diagrama conceptual para ilustrar el principio de la proteólisis con proteasas en la presente invención.
- Sobre la superficie de micropartículas 10 (diámetro promedio de partícula  $D_1$ ), se inmoviliza una proteasa 15. Un cuerpo poroso 20 tiene una pluralidad de poros 29 (diámetro promedio de poro  $D_2$ ), y una proteína sustrato 25 está inmovilizada en los poros. En el método según la presente invención, tal como se describió anteriormente, tanto la proteasa 15 como la proteína sustrato 25 se inmovilizan sobre fases sólidas en una microrregión, y se realiza la proteólisis con proteasas poniendo en contacto las fases sólidas.
- El diámetro promedio de partícula  $D_1$  de las micropartículas 10 es mayor que el diámetro promedio de poro  $D_2$  del cuerpo poroso 20. Por tanto, las micropartículas 10 pueden acceder a las partes someras de los poros 29 y su vecindad, pero no pueden acceder a las partes profundas de los poros 29. Como resultado, la proteasa 15 inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas 10 no puede acceder a las partes profundas de los poros 29. En la figura 1, una línea de puntos cerca de los poros 29 indica el límite de la región accesible para la proteasa 15.
- De esta forma, la accesibilidad de la proteasa 15 a la proteína sustrato 25 en los poros 29 está limitada de forma selectiva de sitio, de modo que aumenta la probabilidad relativa de accesibilidad de la proteasa 15 al lado de la fase

líquida (sitio en forma de "Y" en la figura 1) de la proteína sustrato. Esto permite someter la proteína sustrato 25 a una proteólisis con proteasas selectiva de sitio para obtener fragmentos de péptidos

#### Proteína sustrato

5 La proteína sustrato 25 es una proteína que se va a analizar. El tipo de proteína sustrato no está particularmente limitada. Sin embargo, desde el punto de vista de realizar la proteólisis selectiva de sitio, la proteína sustrato preferiblemente tiene un diámetro molecular mayor que el de la proteasa 15. La proteína sustrato puede ser un complejo de proteínas. Con respecto al diámetro molecular, está disponible un valor determinado basándose en el análisis estructural mediante rayos X o RMN en diversos documentos o bases de datos. Por ejemplo, el diámetro molecular de un anticuerpo es de aproximadamente 15 nm. Como alternativa, el diámetro molecular puede determinarse, por ejemplo, mediante dispersión de ángulo pequeño de rayos X o puede calcularse aproximadamente a partir de un peso molecular. Como ejemplos de referencia, la tabla 1 muestra los pesos moleculares y los diámetros moleculares de proteínas empleadas como moléculas marcadoras para determinar las propiedades de separación de una membrana de ultrafiltración.

Tabla 1

proteína	peso molecular [Da]	diámetro molecular [nm]
sacarosa	340	1,1
rafinosa	590	1,3
vitamina B12	1.360	1,7
bacitracina	1.410	1,7
insulina	5.700	2,7
citocromo C	13.400	3,8
mioglobina	17.000	4,0
$\alpha$ -quimotripsinógeno	25.000	4,6
pepsina	35.000	5,0
ovoalbúmina	43.000	5,6
albúmina bovina	67.000	6,4
aldolasa	142.000	8,2
$\gamma$ -globulina	150.000	8,4

15 La proteína sustrato 25 es preferiblemente una proteína que pueda unirse de modo específico de sitio dentro de los poros 29 del cuerpo poroso 20. La unión específica de sitio de la proteína sustrato 25 permite someter otro sitio distinto al sitio de unión a una proteólisis con proteasas selectiva. Por ejemplo, una proteína que porta, en su extremo C- o N-terminal, una secuencia marcadora, tal como un marcador His (un péptido marcador que contiene aproximadamente 6 restos histidina continuos) o un péptido biotinilado, una enzima que se une específicamente a un sustrato específico o similares, también puede utilizarse como proteína que puede unirse de modo específico de sitio.

25 En la presente invención, un anticuerpo se emplea de modo particularmente preferible como proteína sustrato que puede unirse de modo específico de sitio dentro de los poros del cuerpo poroso. La inmovilización del dominio Fc del anticuerpo sobre el cuerpo poroso 20 permite someter el dominio Fab del anticuerpo a una proteólisis con proteasas selectiva. Aunque el tipo de anticuerpo no está particularmente limitado, se prefiere un anticuerpo monoclonal. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos humanos, tales como panitumumab (Vectibix), ofatumumab (Arzerra), golimumab (Simponi), e ipilimumab (Yervoy); anticuerpos humanizados, tales como tocilizumab (Actemra), trastuzumab (Herceptin), bevacizumab (Avastin), omalizumab (Xolair), mepolizumab (Bosatria), gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg), palivizumab (Synagis), ranibizumab (Lucentis), certolizumab (Cimzia), ocrelizumab, mogamulizumab (Poteligeo), y eculizumab (Soliris); y anticuerpos quiméricos, tales como rituximab (Rituxan), cetuximab (Erbix), infliximab (Remicade), y basiliximab (Simulect). Estos anticuerpos se emplean como fármacos de anticuerpos (fármacos dirigidos de modo molecular), y las concentraciones de los anticuerpos en sangre deben cuantificarse en ensayos clínicos y similares.

Tal como se describirá a continuación con referencia a los ejemplos, según el método de la presente invención, el dominio Fab del anticuerpo monoclonal puede someterse a una proteólisis con proteasas selectiva de sitio para obtener fragmentos de péptidos, y el anticuerpo puede identificarse y cuantificarse mediante espectrometría de masas de los fragmentos de péptidos obtenidos. El método de análisis según la presente invención es un método en el que fragmentos de péptidos derivados de la región variable del anticuerpo se detectan para identificar (detectar) o cuantificar el anticuerpo, es decir, un método en el que los fragmentos de péptidos derivados del anticuerpo se miden directamente. Por tanto, el método de análisis según la presente invención no requiere una sustancia de unión específica, tal como un antígeno, y, por tanto, puede aplicarse independientemente del tipo de anticuerpo. Por tanto, el método según la presente invención puede aplicarse no solo a los anticuerpos mencionados anteriormente, sino también a anticuerpos monoclonales recientemente desarrollados.

#### Cuerpo poroso

El material del cuerpo poroso 20 no está particularmente limitado, con la condición de que el material tenga poros 29. Aunque los poros mostrados en la figura 1 tienen forma semiesférica, la forma de los poros no está particularmente limitada. También puede emplearse un cuerpo poroso con agujeros que lo atraviesan, tal como una membrana porosa.

Para el cuerpo poroso 20 puede utilizarse carbono activado, una membrana porosa, esferas de resina porosa, partículas metálicas o similares. Entre estos, se prefiere un cuerpo poroso que se una específicamente con la proteína sustrato, y se prefiere particularmente un cuerpo poroso que pueda unirse de modo específico de sitio con la proteína sustrato. Por ejemplo, las esferas de carga de columnas de afinidad empleadas para purificar una proteína específica o similares pueden cumplir dicho requisito.

El cuerpo poroso 20 preferiblemente empleado en la presente invención es un cuerpo poroso en el que una molécula conectora 21 que puede interactuar de modo específico de sitio con la proteína sustrato 25 está inmovilizada en sus poros 29. Los ejemplos de la interacción entre la proteína sustrato y la molécula conectora incluyen los enlaces químicos, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, formación de complejos, interacción hidrófoba, interacción de van der Waals, interacción electrostática, e interacción estereoselectiva.

La molécula conectora óptima puede seleccionarse de modo apropiado, dependiendo del tipo o sitio de unión de la proteína sustrato, de grupos funcionales, tales como un grupo amino, un grupo carboxilo, y un grupo epoxi; compuestos marcadores, tales como biotina y digoxigenina; proteínas, tales como avidina, estreptavidina, proteína A, proteína G, e inmunoglobulina; diversos ligandos; compuestos sustrato para enzimas; sílice; y quelatos de metales.

Se emplea preferiblemente proteína G, proteína A o similares como la molécula conectora 21 cuando la proteína sustrato 25 es un anticuerpo. La proteína A o la proteína G se une de modo específico de sitio con el dominio Fc del anticuerpo. El uso del cuerpo poroso 20 que presenta la molécula conectora 21, tal como proteína A o proteína G, inmovilizada en los poros 29 permite que el dominio Fc del anticuerpo (proteína sustrato 25) sea inmovilizado de modo específico de sitio en los poros, de forma que el dominio Fab del anticuerpo está localizado en el lado de la fase líquida (cerca de las partes someras de los poros). Esta inmovilización del anticuerpo en los poros en una dirección concreta controla la orientación del anticuerpo en los poros y, por tanto, el dominio Fab puede proteolizarse de modo selectivo de sitio con la proteasa.

Además, cuando la proteína sustrato se inmoviliza en los poros para que esté presente en un microentorno en la interfase entre la fase sólida y la fase líquida, es probable que la proteína sustrato se desnaturalice y que se alteren las fluctuaciones moleculares, de modo que aumenta la probabilidad de ser atacada por la proteasa. Además, en la presente invención, la proteasa se inmoviliza sobre las partículas y, por tanto, se crea un entorno en el que la proteasa es estéricamente estable y es menos probable que se produzca una autólisis. Se considera que esto aumenta la estabilidad de la proteasa. Por tanto, según el método de la presente invención, puede realizarse una proteólisis con proteasas selectiva de sitio y, además, puede mantenerse una alta actividad de la proteasa.

El tamaño de los poros 29 del cuerpo poroso 20 no está particularmente limitado. El tamaño de los poros preferiblemente se determina tomando en consideración el diámetro molecular de la proteína sustrato, etc., de modo que el extremo de la proteína sustrato, es decir, el sitio que se va a proteolizar de modo selectivo, se localice cerca de las partes someras de los poros 29 cuando la proteína sustrato 25 se inmoviliza. El diámetro promedio de poro  $D_2$  del cuerpo poroso 20 se ajusta de modo apropiado para que esté en el intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 10 nm a 500 nm y para que sea menor que el diámetro promedio de partícula  $D_1$  de las micropartículas 10. El diámetro promedio de poro  $D_2$  del cuerpo poroso 20 es, por ejemplo, preferiblemente de aproximadamente 20 nm a 200 nm, más preferiblemente de aproximadamente 30 nm a 150 nm. En particular, cuando la proteína sustrato 25 es un anticuerpo, para inmovilizar el dominio Fc del anticuerpo en los poros para someter el dominio Fab del anticuerpo a una proteólisis con proteasas selectiva de sitio, el diámetro de poro del cuerpo poroso es preferiblemente de 30 nm a 150 nm, más preferiblemente de 40 nm a 120 nm, aún más preferiblemente de 50 nm a 100 nm.

El tamaño de la molécula conectora se selecciona tomando en consideración el tamaño de los poros o el tamaño de la proteína sustrato, de modo que el sitio de la proteólisis selectiva de la proteína sustrato se localice cerca de las

partes someras de los poros. El tamaño de una molécula en la que la molécula conectora se une a la proteína sustrato, es preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 1,5 veces, más preferiblemente de aproximadamente 0,6 a 1,2 veces, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,7 a 1,1 veces, en particular preferiblemente de aproximadamente 0,8 a 1 veces el diámetro de poro del cuerpo poroso. Cuando la molécula conectora no está inmovilizada sobre el cuerpo poroso 20 y la proteína sustrato se une directamente dentro de los poros del cuerpo poroso, el diámetro molecular de la proteína sustrato y el diámetro de poro del cuerpo poroso preferiblemente cumplen la anterior relación.

#### Inmovilización de la proteína sustrato

El método para inmovilizar la proteína sustrato 25 en los poros 29 del cuerpo poroso 20 no está particularmente limitado, y puede adoptarse un método apropiado dependiendo de las propiedades de la proteína sustrato y el cuerpo poroso (o la molécula conectora inmovilizada sobre el cuerpo poroso), etc. Por ejemplo, cuando el cuerpo poroso presenta proteína A o proteína G inmovilizada en sus poros, el anticuerpo puede inmovilizarse con facilidad en los poros mezclando una suspensión del cuerpo poroso y una disolución que contiene el anticuerpo.

La proporción cuantitativa entre el cuerpo poroso y la proteína sustrato puede ajustarse de modo apropiado dependiendo del objetivo. Por ejemplo, en el caso del análisis cuantitativo de la proteína sustrato, se desea que casi la cantidad completa de la proteína sustrato en una muestra se inmovilice sobre el cuerpo poroso. Por tanto, la proporción cuantitativa se ajusta preferiblemente de modo que la cantidad del cuerpo poroso sea mayor que la cantidad calculada de la proteína sustrato contenida en la muestra.

#### Proteasa

La proteasa 15 reconoce la secuencia de aminoácidos de la proteína sustrato y proteoliza selectivamente un enlace específico en una secuencia específica. En la presente invención, la proteína sustrato 25 se inmoviliza en los poros 29 del cuerpo poroso 20, y la proteasa 15 proteoliza la proteína sustrato 25 en un sitio específico de la secuencia de aminoácidos, de modo que se obtienen fragmentos de péptidos.

Los ejemplos de proteasa incluyen tripsina (que proteoliza un péptido en el lado C-terminal de restos aminoácidos básicos (Arg y Lys)), lisil endopeptidasa (que proteoliza un péptido en el lado C-terminal de un resto Lys), arginina endopeptidasa (que proteoliza un péptido en el lado C-terminal de un resto Arg), quimotripsina (que proteoliza un péptido en el lado C-terminal de restos aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, y Trp)), proteasa V8 (que proteoliza un péptido en el lado C-terminal de un resto Glu), pepsina, y papaína. Pueden emplearse dos o más de estas proteasas en combinación.

Cuando los fragmentos de péptidos de la proteína sustrato después de la proteólisis con proteasas se someten a una espectrometría de masas como una muestra de medición, la proteasa que se va a utilizar preferiblemente es una proteasa con baja autólisis y alta selectividad por una secuencia que se va a proteolizar. Cuando se emplea una proteasa disponible en el mercado, se emplea preferiblemente una proteasa de calidad de espectrometría de masas o una proteasa de calidad de secuenciación. Por ejemplo, se sabe que la tripsina nativa procedente de un cuerpo vivo tiene baja especificidad para un sitio de proteólisis, porque se genera pseudotripsina, que muestra una actividad similar a la quimotripsina, debido a la autólisis. Por tanto, está disponible en el mercado una tripsina de calidad de espectrometría de masas que logra una alta resistencia a la autólisis debido a la metilación reductora de los restos lisina de la tripsina.

Para mejorar la selectividad de sitio de la proteólisis con proteasas de la proteína sustrato, es importante limitar la región en la cual la proteasa puede acceder a la proteína sustrato. Por tanto, el diámetro molecular de la proteasa es preferiblemente más pequeño que el de la proteína sustrato. De modo más específico, el diámetro molecular de la proteasa es preferiblemente 10 nm o menor, más preferiblemente 8 nm o menor, preferiblemente 6 nm o menor, en particular preferiblemente 5 nm o menor. Una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, tal como tripsina o lisil endopeptidasa, tiene un diámetro molecular de aproximadamente 4 nm (véase la anterior tabla 1).

Entre las proteasas mencionadas anteriormente, la tripsina se emplea preferiblemente en particular en la presente invención. Tal como se describió anteriormente, la tripsina tiene un diámetro molecular pequeño y su sitio activo está presente dentro de su molécula. Esto limita la región en la cual el sitio activo puede acceder a la proteína sustrato, lo cual permite mejorar la selectividad de sitio de la proteólisis con proteasas. En particular, cuando la proteína sustrato es un anticuerpo, la proteasa que se va a utilizar es preferiblemente tripsina.

En estudios de análisis de proteoma, la digestión con una combinación de tripsina y lisil endopeptidasa ha atraído la atención en años recientes como técnica para mejorar la tasa de recuperación de fragmentos de péptidos (J. Proteome Res., 2012, 11(11), 5145-5156). Se considera que la razón de esto es que la tripsina tiene la propiedad de permitir que una reacción de descomposición avance en etapas desde el exterior de una estructura estérica, y una lisil endopeptidasa primero proteoliza principalmente la región bisagra de un anticuerpo. Por otra parte, en la presente invención, se prefiere utilizar la tripsina por sí sola, o cuando se emplea la lisil endopeptidasa o similar en combinación con tripsina, la cantidad de tripsina es preferiblemente 90% o mayor que la cantidad total de proteasas utilizadas, para suprimir la proteólisis de la región bisagra de un anticuerpo y para proteolizar selectivamente el

dominio Fab (más preferiblemente, la región V del dominio Fab) del anticuerpo.

#### Micropartículas

5 Las micropartículas 10 se emplean para inmovilizar la proteasa 15 sobre su superficie para controlar la accesibilidad de la proteasa a la proteína sustrato 25 inmovilizada en los poros 29 del cuerpo poroso 20. Por tanto, el diámetro promedio de partícula  $D_1$  de las micropartículas 10 es preferiblemente mayor que el diámetro promedio de poro  $D_2$  del cuerpo poroso 20, de modo que las micropartículas 10 no entran en la parte profunda de los poros 29 del cuerpo poroso 20. El diámetro promedio de partícula  $D_1$  de las micropartículas 10 es preferiblemente 1,2 veces o más, aún más preferiblemente 1,5 veces o más, en particular preferiblemente 1,8 veces o más el diámetro promedio de poro  $D_2$  del cuerpo poroso 20.

10 Aunque la forma de las micropartículas 10 no está particularmente limitada, se prefieren las micropartículas esféricas desde el punto de vista de igualar la accesibilidad de la proteasa a los poros 29 del cuerpo poroso 20. Además, las micropartículas 10 preferiblemente tienen un diámetro promedio de partícula uniforme.

15 Cuando el diámetro promedio de poro del cuerpo poroso 20 es de aproximadamente 30 a 150 nm, el diámetro promedio de partícula  $D_1$  de las micropartículas 10 es preferiblemente 100 nm o mayor, más preferiblemente 150 nm o mayor. Cuando la proteína sustrato 25 es un anticuerpo, y el diámetro promedio de poro del cuerpo poroso 20 es de aproximadamente 50 nm a 100 nm, el diámetro promedio de partícula de las micropartículas 10 es preferiblemente 120 nm o mayor, más preferiblemente 150 nm o mayor, en particular preferiblemente 170 nm o mayor. El límite superior del diámetro promedio de partícula  $D_1$  de las micropartículas 10 no está particularmente limitado, pero preferiblemente es 1  $\mu\text{m}$  o menor, más preferiblemente 500 nm o menor, aún más preferiblemente 300 nm o menor, desde el punto de vista de mejorar la eficacia de la proteólisis con proteasas.

20 El material de las micropartícula 10 no está particularmente limitado, con la condición de que la proteasa pueda inmovilizarse sobre su superficie, y de forma apropiada se emplea un metal, una resina o similares. Como alternativa, puede emplearse un material obtenido revistiendo la superficie de un metal con una resina, un material obtenido mediante el revestimiento de la superficie de la resina con un metal, o similares.

25 Las micropartículas 10 preferiblemente tienen una superficie capaz de suprimir la adsorción de proteínas no específica y de inmovilizar selectivamente la proteasa sobre ella. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1, se emplean de forma adecuada micropartículas cuya superficie se modifica mediante un espaciador 11 que puede unirse específicamente con la proteasa. El espaciador es preferiblemente un espaciador que pueda unirse con la proteasa y que no desactive la proteasa.

30 Además, desde el punto de vista de controlar los límites de accesibilidad de la proteasa 15 inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas 10, el espaciador 11 preferiblemente tiene un diámetro molecular pequeño. El diámetro molecular del espaciador es preferiblemente 5 nm o menor, más preferiblemente 3 nm o menor, aún más preferiblemente 2 nm o menor. Además, el peso molecular del espaciador es preferiblemente 2000 o menor, más preferiblemente 1500 o menor, aún más preferiblemente 1000 o menor, en particular preferiblemente 800 o menor. 35 La molécula espaciadora que tiene un diámetro molecular dentro del anterior intervalo y que es capaz de inmovilizar la proteasas preferiblemente no es una proteína y preferiblemente contiene un grupo funcional, tal como un grupo amino, un grupo amida, un grupo éster, un grupo epoxi, un grupo carboxilo, biotina, avidina, o un quelato. Por ejemplo, el espaciador empleado preferiblemente para inmovilizar la tripsina contiene un grupo éster. Además, también se emplea preferiblemente como espaciador una molécula que presenta un grupo éster activado para 40 mejorar la eficacia de la inmovilización de la proteasa.

En la presente invención, también pueden emplearse micropartículas disponibles en el mercado modificadas con una molécula espaciadora. Por ejemplo, en el mercado están disponibles micropartículas modificadas con una molécula espaciadora que presenta un grupo éster activado por N-hidroxisuccinimida como micropartículas para la purificación por afinidad con el nombre comercial de "FG beads NHS".

45 Preparación de las micropartículas con proteasa inmovilizada

El método para inmovilizar la proteasa 15 sobre la superficie de las micropartículas 10 no está particularmente limitado, y puede adoptarse un método apropiado dependiendo de las propiedades de la proteasa y de las micropartículas (o de la molécula espaciadora que modifica la superficie de las micropartículas), etc. Por ejemplo, cuando se inmoviliza la tripsina sobre la superficie de las micropartículas modificadas con el espaciador, se mezcla 50 una suspensión de las micropartículas y una disolución que contiene tripsina. De esta forma, la proteasa puede inmovilizarse sobre la superficie de las micropartículas.

Después de inmovilizar la proteasa sobre la superficie de las micropartículas, preferiblemente se desactivan las porciones activas que no se unen con la proteasa sobre la superficie de las micropartículas. Por ejemplo, si la molécula espaciadora que no presenta la proteasa inmovilizada sobre ella está presente sobre la superficie de las 55 micropartículas, puede aparecer el problema de que la molécula espaciadora sin unir se una a una impureza, o similar, en una muestra de modo que la proteólisis con la proteasa se vea afectada de modo adverso, el problema de que los fragmentos de péptidos producidos por la proteólisis con la proteasa se inmovilicen sobre las

micropartículas, o similares. Estos problemas se evitan bloqueando el espaciador no unido después de la inmovilización de la proteasa. La desactivación de las porciones activas que no se unen con la proteasa preferiblemente se realiza mediante modificación química. Por ejemplo, un grupo éster activado se desactiva formando un enlace amida a través de una reacción con una amina.

## 5 Proteolisis con proteasas

La proteína sustrato se somete a una proteolisis con proteasas poniendo en contacto entre sí el cuerpo poroso 20 que presenta la proteína sustrato 25 inmovilizada sobre él y las micropartículas 10 que presentan la proteasa 15 inmovilizada sobre su superficie, en un líquido, de modo que se producen fragmentos de péptidos.

10 En la presente invención, la condición de la proteolisis de la proteasa no está particularmente limitada y pueden adoptarse de modo apropiado condiciones similares a las de la digestión con proteasas general. Por ejemplo, la proteolisis con proteasas preferiblemente se realiza mediante una incubación en una disolución tampón que tiene un pH ajustado a aproximadamente el valor de pH óptimo de la proteasa a una temperatura habitualmente de aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 4 horas a 20 horas.

15 La proporción de mezcla cuantitativa entre el cuerpo poroso que presenta la proteína sustrato inmovilizada sobre él y las micropartículas que presentan la proteasa inmovilizada sobre su superficie tampoco está particularmente limitada, y puede ajustarse de modo que la cantidad de la proteasa sea apropiada para la cantidad de la proteína sustrato. Se advertirá que la digestión con proteasa generalmente se realiza en condiciones en las que la proporción (proporción en peso) de proteína sustrato:proteasa = aproximadamente 100:1 a 20:1. Por otra parte, en la presente invención, la cantidad de la proteasa es preferiblemente mayor que la que se emplea en general en la digestión con proteasas, porque el acceso entre la proteína sustrato y la proteasa está físicamente limitado debido al uso  
20 combinado del cuerpo poroso y las micropartículas. Por ejemplo, la proporción de proteína sustrato:proteasa es preferiblemente de aproximadamente 30:1 a 3:1, más preferiblemente de aproximadamente 15:1 a 4:1, aún más preferiblemente de aproximadamente 10:1 a 5:1.

25 En general, cuando un anticuerpo en una muestra biológica, tal como sangre, se somete a una digestión con proteasas selectiva, la digestión con proteasas debe realizarse después de que la muestra primero se mezcle con partículas que presentan proteína G o similar inmovilizada sobre ellas para inmovilizar el anticuerpo a las partículas, se retiren las impurezas y después se eluya el anticuerpo de las partículas y se desnaturalice con urea o guanidina. Por contraste, en el método según la presente invención, la proteolisis con proteasas se realiza en un estado en el que el anticuerpo se mantiene inmovilizado sobre el cuerpo poroso. Además, los fragmentos de péptidos producidos  
30 por la proteolisis con proteasas están presentes en una fase líquida y, por tanto, los fragmentos de péptidos del dominio Fab del anticuerpo pueden obtenerse de modo selectivo de sitio sin realizar una elución o desnaturalización del anticuerpo. De esta forma, según el método de la presente invención, los fragmentos de péptidos pueden recuperarse de forma selectiva de sitio mediante una operación más sencilla, comparado con el método convencional.

## 35 Kit para preparar fragmentos de péptidos

Los fragmentos de péptidos pueden prepararse empleando un kit previamente preparado para preparar fragmentos de péptidos según la presente invención. El kit para preparar fragmentos de péptidos según la presente invención comprende un cuerpo poroso que tiene poros capaces de inmovilizar una proteína sustrato, y micropartículas capaces de inmovilizar una proteasa sobre su superficie. El kit puede comprender además una proteasa. Las  
40 micropartículas pueden proporcionarse en un estado en el que una proteasa esté inmovilizada sobre su superficie.

La figura 3 es un diagrama que muestra una realización del kit para preparar fragmentos de péptidos según la presente invención. En la figura 3, las micropartículas 110 capaces de inmovilizar una proteasa sobre su superficie se proporcionan como una suspensión 131. El kit puede comprender además una proteasa. Las micropartículas 110 pueden proporcionarse en un estado en el que una proteasa esté inmovilizada sobre su superficie. Una columna de centrifugación 132 comprende un recipiente interno 135 y un recipiente externo 136, y estos están configurados para estar unidos de modo que puedan separarse. Al fondo del recipiente interno 135 se proporciona una membrana porosa 120 que presenta poros capaces de inmovilizar una proteína sustrato. La membrana porosa 120 tiene un diámetro de poro tal que evita que un líquido permee la membrana porosa 120 a una presión normal.

50 Cuando se preparan fragmentos de péptidos empleando una columna de centrifugación, una muestra (por ejemplo, un espécimen, tal como sangre) que contiene una proteína sustrato primero se coloca en el recipiente interno 135 de la columna de centrifugación para poner en contacto la muestra con la membrana porosa. Si es necesario, el recipiente puede agitarse para que la muestra establezca un contacto uniforme con la membrana porosa. Esta operación permite que la proteína sustrato, tal como un anticuerpo, se inmovilice en los poros de la membrana porosa 120.

55 El líquido de muestra, después de la inmovilización de la proteína sustrato sobre la membrana porosa, preferiblemente se retira del recipiente interno 135. El líquido puede retirarse por la abertura del recipiente interno mediante manipulación, tal como pipeteado, o puede salir por el fondo del recipiente interno a través de la membrana porosa mediante centrifugación o similar. Después, si es necesario, se realiza un lavado con una

disolución apropiada.

Las micropartículas 110 que presentan una proteasa inmovilizada sobre su superficie se añaden al recipiente interno 135 provisto con la membrana porosa 120 que presenta la proteína sustrato inmovilizada sobre ella. Tal como se describió anteriormente, la proteasa puede inmovilizarse previamente sobre las micropartículas o puede inmovilizarse sobre la superficie de las micropartículas justo antes del uso.

Si es necesario, puede añadirse después una disolución, tal como un tampón, para, por ejemplo, optimizar las condiciones de la proteólisis con proteasas. La proteína sustrato inmovilizada sobre la membrana porosa 120 en el recipiente interno es proteolizada por la proteasa inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas 110. Tal como se describió anteriormente, las condiciones de la proteólisis con proteasas pueden ajustarse de modo apropiado. Los fragmentos de péptidos producidos por la proteólisis con proteasas migran hacia la fase líquida.

Los fragmentos de péptidos producidos mediante la proteólisis selectiva de sitio de la proteína sustrato se obtienen recuperando la fase líquida después de la proteólisis con proteasas. El método para recuperar la fase líquida no está particularmente limitado. La fase líquida puede recuperarse simplemente mediante centrifugación. En este caso, la fase líquida sale por el fondo del recipiente interno 135 a través de la membrana porosa y se recupera en el recipiente externo 136. Después puede realizarse una operación, tal como un lavado o elución, para, por ejemplo, la elución de los fragmentos de péptidos contenidos en los poros de la membrana porosa.

Tal como se describió anteriormente, el uso del kit permite realizar con más sencillez la operación de preparar los fragmentos de péptidos según la presente invención y automatizar fácilmente la operación empleando un dispositivo. En particular, la tripsina, o similar, puede mantener su actividad incluso en un estado en el que se encuentra inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas. Por tanto, la operación de preparar fragmentos de péptidos puede simplificarse aún más proporcionando, como componente del kit, una proteasa en un estado en el que se encuentra inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas.

#### Análisis

Una muestra que contiene los fragmentos de péptidos obtenidos anteriormente puede analizarse mediante cromatografía o espectrometría de masas para identificar o cuantificar la proteína sustrato. En la presente invención, la proteína sustrato se somete a un tratamiento con proteasas selectivo de sitio y, por tanto, se reduce el número de tipos de fragmentos de péptidos contenidos en una muestra. Por tanto, las condiciones de análisis mediante espectrometría de masas o similar pueden ajustarse con facilidad. Si es necesario, la muestra empleada para el análisis puede someterse a un pretratamiento, tal como desalación, solubilización, extracción, concentración o secado, antes del análisis.

La espectrometría de masas resulta adecuada para la identificación o la cuantificación de la proteína sustrato a partir de los fragmentos de péptidos producidos mediante la proteólisis con proteasas. La espectrometría de masas puede determinar las secuencias de aminoácidos de fragmentos de péptidos y, por tanto, puede determinar si los fragmentos de péptidos proceden o no de una proteína específica, tal como un anticuerpo. Además, las concentraciones de los fragmentos de péptidos en la muestra pueden determinarse basándose en las intensidades de los picos.

El método de ionización empleado en la espectrometría de masas no está particularmente limitado y puede ser, por ejemplo, ionización de electrones (EI), ionización química (CI), desorción de campo (FD), bombardeo de átomos rápidos (FAB), ionización de desorción de láser asistida con matriz (MALDI), o ionización de electronebulización (ESI). El método para analizar la muestra ionizada no está particularmente limitado, y puede determinarse de modo apropiado dependiendo del método de ionización empleado. Los ejemplos del método incluyen un método de deflexión magnética, un método de cuadrupolo (Q), un método de atrapamiento de iones (IT), un método de tiempo de vuelo (TOF), y un método de resonancia de ciclotrón de iones de transformada de Fourier (FT-ICR). Como alternativa, puede emplearse un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple o similar para realizar un análisis de MS/MS o una espectrometría de masas de múltiples etapas, tal como MS<sup>3</sup> o una MS de orden superior.

Con el fin, por ejemplo, de separar de modo más fiable los fragmentos de péptidos para mejorar la precisión del análisis, la muestra puede separarse y concentrarse mediante una cromatografía líquida (LC), extracción en fase sólida (SPE), o similares, antes de someterla a una espectrometría de masas. Cuando la muestra se separa mediante LC, puede emplearse LC/MS que incluye LC antes de la espectrometría de masas de modo que un eluato de LC directamente se ionice y se somete a una espectrometría de masas. La muestra puede analizarse mediante LC/MS/MS o LC/MS<sup>n</sup>, que es una combinación de LC y espectrometría de masas en tándem. El eluato de LC puede fraccionarse una vez antes de someterse a una espectrometría de masas. La columna para LC o el vehículo para SPE no están particularmente limitados y pueden seleccionarse de modo apropiado. Por ejemplo, puede emplearse una columna hidrofóbica, tal como C30, C18, C8, o C4, que se usa en general para el análisis de péptidos, o un vehículo para la cromatografía de afinidad hidrofoba.

Pueden emplearse bases de datos existentes para identificar una proteína, tal como un anticuerpo, basándose en el resultado de la espectrometría de masas. En la presente invención, se emplean fragmentos de péptidos obtenidos mediante una proteólisis con proteasas selectiva de sitio de la proteína sustrato, tal como un anticuerpo, y, por tanto,

se aumenta la tasa de aciertos en la búsqueda en bases de datos o la precisión de los datos. Además, la proteína sustrato también puede identificarse identificando las secuencias de aminoácidos de los fragmentos de péptidos mediante una espectrometría de masas de múltiples etapas o similares. Por ejemplo, cuando la proteína sustrato es un anticuerpo, el anticuerpo puede identificarse determinando la secuencia de un fragmento de péptido que contiene al menos parte de la secuencia de aminoácidos de una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene una secuencia de aminoácidos específica para el anticuerpo.

Cuando el anticuerpo se detecta o se cuantifica basándose en el resultado de la detección de un fragmento de péptido específico que contiene la secuencia de CDR, el péptido que se va a detectar preferiblemente tiene de aproximadamente 5 a 30 restos aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 7 a 25 restos aminoácidos. Si el número de restos aminoácidos es demasiado pequeño, el péptido que se va a detectar resulta difícil de distinguir de los fragmentos de péptidos procedentes de impurezas o de otros sitios de la misma proteína, lo cual puede provocar una detección falsa, etc. Por otra parte, si el número de restos aminoácidos es demasiado alto, la detección se dificulta o se reduce cuantitativamente porque la ionización se dificulta o similar.

Cuando se cuantifica la concentración de la proteína sustrato, la cantidad de la proteína sustrato puede calcularse basándose en las áreas de los picos o las intensidades de los picos de los iones de los fragmentos de péptidos detectados (en el caso de una MS de múltiples etapas, los fragmentos de iones obtenidos por la fragmentación de los iones de los fragmentos de péptidos). Por ejemplo, las concentraciones de los fragmentos de péptidos en la muestra se calculan basándose en la asociación entre una curva de calibración previamente determinada y las áreas de los picos, la asociación entre las áreas de los picos derivadas de un patrón interno añadido a la muestra y las áreas de los picos derivadas de la muestra, o similares, y la cantidad o la concentración de la proteína sustrato se calcula basándose en la concentración de los fragmentos de péptidos.

Tal como se describió anteriormente, según la presente invención, la proteína sustrato y la proteasa se inmovilizan sobre fases sólidas para controlar físicamente el acceso entre ellas, de modo que un sitio específico en la proteína sustrato puede someterse a una proteólisis con proteasas selectiva de sitio. Los fragmentos de péptidos obtenidos de este modo pueden analizarse mediante un método conocido, tal como espectrometría de masas y, por tanto, la proteína en la muestra puede identificarse o cuantificarse sin procesos complicados.

El método según la presente invención resulta particularmente adecuado para la detección o la cuantificación de un anticuerpo. La secuencia o la cantidad de un fragmento de péptido que contiene la secuencia de aminoácidos de una región determinante de la complementariedad puede determinarse mediante espectrometría de masas de una muestra de un fragmento de péptido obtenida sometiendo la región Fab de un anticuerpo a una proteólisis con proteasas selectiva. Además, el método según la presente invención puede ponerse en práctica mediante una operación sencilla, puede asegurar la reproducibilidad o cuantitabilidad, y también puede automatizarse. Por tanto, el método puede aplicarse también a la investigación fundamental, tal como a análisis farmacocinéticos, análisis interactivos que emplean una reacción de antígeno-anticuerpo, diversos análisis de interactomas, y la identificación de proteínas inmunoprecipitadas. Además, puede esperarse que el método según la presente invención se aplique al análisis de secuenciación de fármacos biomoleculares, tales como fármacos de anticuerpos, garantías de seguridad, confirmación de la identidad de fármacos genéricos, etc.

### Ejemplos

A continuación, se describirán ejemplos experimentales en los que una muestra de fragmentos de péptidos obtenida sometiendo a la inmunoglobulina G (IgG) humana o al trastuzumab (nombre comercial: Herceptin) a una proteólisis con proteasas mediante el método según la presente invención, se somete a una espectrometría de masas. Debe advertirse que la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

En la siguiente descripción, % representa el porcentaje en peso, a menos que se indique lo contrario. Los reactivos y similares utilizados en los ejemplos experimentales son los siguientes.

- Tripsina (de calidad de secuenciación, Promega)
- Lisil endopeptidasa (de calidad de espectrometría de masas, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)
- Ácido 2-morfolinoetansulfónico (MES, DOJINDO LABORATORIES)
- Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etansulfónico (HEPES, DOJINDO LABORATORIES)
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Los reactivos y similares distintos de los listados anteriormente, tales como disolventes orgánicos, se adquirieron en Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Se emplearon las siguientes disoluciones tampón cuyos valores de pH se ajustaron con un pH-metro preciso.

- Tampón MES: MES-NaOH 25 mM, pH 5,5

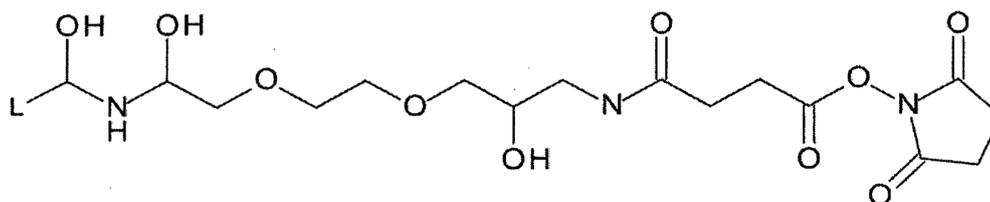
- Tampón HEPES: HEPES-NaOH 25 mM, pH 7,0
- Tampón de etanolamina: etanolamina-HCl 1 M, pH 8,0
- Tampón Tris: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0

*Preparación de un cuerpo poroso con anticuerpos inmovilizados*

- 5 Una suspensión de esferas de resina porosa que presentag proteína G unida a su superficie (Pierce Biotechnology, resina Protein G UltraLink, diámetro promedio de partícula: 100  $\mu$ m, diámetro de poro: de 50 a 100 nm) de 5  $\mu$ l se añadió a 200  $\mu$ l de tampón MES, y después se añadió una disolución de anticuerpo. Tras esto, la mezcla resultante se agitó suavemente a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, de modo que el anticuerpo se inmoviliza mediante su unión a la proteína G sobre la superficie de las esferas de resina. Después, las esferas de resina se precipitaron mediante centrifugación a 4 °C (15000 rpm, 1 min) para retirar el sobrenadante. Tras esto, se repitió dos veces un lavado con tampón Tris y una centrifugación, y las esferas porosas se suspendieron en tampón Tris (200  $\mu$ l). Como disolución de anticuerpo, se empleó una disolución de inmunoglobulina (IgG) humana (10 mg/ml, Sigma-Aldrich) o una disolución de trastuzumab (Herceptin, 20 mg/ml, CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.).

*Preparación de las micropartículas con proteasa inmovilizada*

- 15 Se emplearon micropartículas con un tamaño de nanómetros para la inmovilización de la proteasa (TAMAGAWA SEIKI CO., LTD., esferas FG NHS), que se obtuvieron modificando la superficie de micropartículas que tienen un diámetro promedio de partícula de 190 con un espaciador cuyo grupo carboxilo se activa con N-hidroxisuccinimida (véase la siguiente fórmula química, en la que L representa un sitio de unión que se une a la superficie de las



micropartículas), longitud del espaciador: 1 nm).

- 20 Una suspensión en isopropanol de esferas FG de 50  $\mu$ l se centrifugó a 4 °C (15000 rpm, 5 min) para precipitar las micropartículas y retirar el sobrenadante. Después, las micropartículas se lavaron con metanol. Una disolución que contenía 50  $\mu$ g de proteasa se disolvió en 200  $\mu$ l de tampón HEPES, y la disolución resultante se añadió a las micropartículas para obtener una suspensión en la que las micropartículas están suspendidas. En este momento, se realizó la suspensión de las micropartículas mediante un tratamiento ultrasónico durante unos pocos segundos para evitar el aumento en la temperatura de la suspensión.

- 25 La suspensión de micropartículas se agitó a 4 °C durante 30 minutos y después se centrifugó a 4 °C (15000 rpm, 5 min) para precipitar las micropartículas y retirar el sobrenadante. Después se añadieron 200  $\mu$ l de tampón de etanolamina para suspender las esferas, y la suspensión resultante se agitó a 4 °C durante 30 minutos para bloquear los grupos N-hidroxisuccinimida redundantes sobre la superficie de las micropartículas con etanolamina.
- 30 Después, las micropartículas se precipitaron mediante centrifugación a 4 °C (15000 rpm, 1 min) para retirar el sobrenadante. Tras esto, se repitió dos veces un lavado con tampón Tris y una centrifugación, y las micropartículas se suspendieron en tampón Tris (100  $\mu$ l). La concentración de proteasa de la suspensión fue de 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l.

Experimento 1: Determinación de la cantidad de anticuerpo inmovilizado sobre el cuerpo poroso

- 35 En la preparación del cuerpo poroso con anticuerpos inmovilizados, la cantidad de suspensión de esferas de resina con proteína G unida por 100  $\mu$ g de IgG se cambió al intervalo de 0 a 20  $\mu$ l, y el sobrenadante resultante se analizó mediante electroforesis de SDS-PAGE. Se determinó la cantidad aproximada de IgG no unida remanente en el sobrenadante (cantidad residual de anticuerpo) a partir del número de píxeles por banda en el patrón electroforético resultante. La cantidad residual de anticuerpo tiende a reducirse a medida que aumenta la cantidad de esferas de resina con proteína G unida. Cuando la cantidad de esferas de resina con proteína G unida era de 10  $\mu$ l, la cantidad residual de anticuerpo fue de aproximadamente 3%, a partir de lo cual se confirmó que las especificaciones ofrecidas en el catálogo de las esferas de resina con proteína G unida casi se reprodujo (los datos no se muestra).

Experimento 2: Estudio de la proporción cuantitativa entre el anticuerpo y la proteasa

La suspensión del cuerpo poroso con IgG inmovilizada (proteína G-IgG) y las micropartículas con proteasa inmovilizada (esferas FG-tripsina) se mezclaron y la mezcla resultante se agitó suavemente a 37 °C durante 15

5 horas para realizar la proteólisis con proteasa. Después, la resina se precipitó mediante centrifugación a 4 °C (15000 rpm, 5 min) para recuperar la fase líquida (sobrenadante). El anterior experimento se realizó cambiando la cantidad de micropartículas con proteasa inmovilizada de modo que la cantidad de proteasa era de 5 µg (nivel 1), 10 µg (nivel 2), o 25 µg (nivel 3). En el caso de los niveles 4 a 6, el experimento se realizó de la misma manera, excepto que se empleó directamente un cuerpo poroso sin IgG inmovilizada (resina Protein G UltraLink) en lugar de la suspensión del cuerpo poroso con IgG inmovilizada. Además, en el caso de los niveles 7 y 8, solo las micropartículas con proteasa inmovilizada (esferas FG-tripsina) se incubaron a 37 °C durante 15 horas sin emplear un cuerpo poroso.

10 Los niveles de los anteriores experimentos se muestran en la tabla 2. El peso (µg) mostrado en la tabla 2 representa la cantidad de proteína (IgG o tripsina) en una muestra. Los patrones electroforéticos de SDS-PAGE de los sobrenadantes obtenidos se muestran en la figura 4. En la figura 4, el carril más a la izquierda es un marcador de peso molecular.

Tabla 2

	Proteína G-IgG (µg)	Esferas FG-tripsina (µg)
1	100	5
2	100	10
3	100	25
4	Solo proteína G	5
5	Solo proteína G	10
6	Solo proteína G	25
7	-	5
8	-	10

### *Espectrometría de masas*

15 Los sobrenadantes de los niveles 1 a 6 se analizaron mediante MALDI-TOFMS (AXIMA Resonance MALDI-QIT TOF MS, SHIMADZU CORPORATION). En primer lugar, se añadió ácido trifluoroacético a 20 µl del sobrenadante de modo que su concentración final fue de 0,5%, y la mezcla resultante se purificó empleando una punta cargada con resina hidrófoba (Millipore, ZipTip uC18). Después se realizó la elución dos veces con 1 µl de un eluyente. El eluato resultante se aplicó directamente a una diana de acero inoxidable MALDI y se secó al aire en un banco limpio.

20 Después de secar al aire, se superpuso una capa de 1 µl de una disolución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico 10 mg/ml (DHBA, SHIMADZU GLC Ltd., agua/acetonitrilo = 50/50) para realizar la espectrometría de masas. Se calibró el m/z del aparato con péptido de angiotensina II (m/z = 1046,54, Sigma-Aldrich) y péptido de fragmento de ACTH (m/z = 2465,20, Sigma-Aldrich). Los espectros de MS resultantes se muestran en la figura 5.

25 Todas las bandas de los niveles 4 a 6 mostradas en la figura 4 fueron las mismas que las de los niveles 7 y 8. Además, todos los picos a m/z = 842, 1045, 2211 y 2283 detectados en el caso de los niveles 4 a 6 mostrados en la figura 5 se derivan de fragmentos producidos por la autólisis de la tripsina. Tal como puede observarse a partir de estos resultados, la proteína G no se proteoliza cuando las micropartículas con proteasa inmovilizada y el cuerpo poroso con proteína G unida se ponen en contacto entre sí. Se considera que la razón de esto es que el diámetro de poro del cuerpo poroso es menor que el diámetro de partícula de las micropartículas con proteasa inmovilizada y, por tanto, la tripsina inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas no puede acceder a la proteína G en los poros.

30 Tal como se muestra en la figura 5, en el caso de los niveles 1 a 3, los picos distintos de los picos de los fragmentos producidos por la autólisis de la tripsina se detectaron a m/z = 835, 913, 1187, 1287, 1510, 1678 y 1946, y se confirmó que todos derivaban de fragmentos de péptidos producidos por la proteólisis con tripsina de IgG. Este resultado demuestra que la IgG puede proteolizarse selectivamente sin proteolizar la proteína G inmovilizada sobre el cuerpo poroso poniendo en contacto entre sí el cuerpo poroso con IgG inmovilizada y las micropartículas con tripsina inmovilizada.

35 Tal como puede observarse a partir de la comparación entre los patrones electroforéticos de los niveles 1 a 3 mostrados en la figura 4, a medida que aumenta la cantidad de tripsina, se reducen las bandas de alto peso molecular, es decir, la reacción de proteólisis del anticuerpo avanza con más eficacia. Por otra parte, a medida que aumenta la cantidad de tripsina, la autólisis se hace más pronunciada. Basándose en estos resultados, se estableció el nivel 2 (proporción de sustrato:enzima = 10:1) como la condición patrón para estudiar otra condición que se

describirá a continuación.

Se advertirá que la digestión con proteasa generalmente se realiza en condiciones en las que la proporción de proteína sustrato:proteasa = 100:1 a 20:1. En el método según la presente invención, la accesibilidad entre la proteína sustrato y la proteasa está físicamente limitada por el uso combinado del cuerpo poroso y las micropartículas y, por tanto, la cantidad de proteasa es mayor que la empleada en la digestión con proteasas general. Por esta razón, se calcula que una proporción óptima de sustrato-enzima será de aproximadamente 10:1 a 5:1.

Experimento 3: Evaluación de los péptidos recuperados basándose en el tiempo de proteolisis

La suspensión del cuerpo poroso con IgG inmovilizada (cantidad de IgG sobre la fase sólida: 100 µg) y las micropartículas con proteasa inmovilizada (cantidad de tripsina sobre la fase sólida: 10 µg) se mezclaron de modo que se cumple la condición del nivel 2 seleccionada en el experimento 2, y el tiempo de proteolisis a 37 °C se ajustó a (1) 15 min, (2) 45 min, (3) 90 min, (4) 180 min, (5) 360 min, y (6) 15 hr (durante la noche). La proteolisis con tripsina se realizó de la misma manera que en el experimento 2, excepto por el anterior cambio, y las muestras obtenidas se sometieron a una espectrometría de masas. Los espectros de MS resultantes se muestran en la figura 6.

Tal como puede observarse en la figura 6, a medida que aumenta el tiempo de proteolisis, los picos de los fragmentos de péptidos aumentan, es decir, las cantidades de fragmentos de péptidos recuperados aumentan. La tasa de recuperación de los fragmentos de péptidos es mayor en el caso de tiempo de proteolisis durante la noche (6) que en el caso de 360 min (5). En particular, la acumulación de fragmentos producidos con facilidad por la proteolisis con proteasa a m/z = 1187, 1510, 1678, etc. tiende a ser más pronunciada. Sin embargo, estos fragmentos se derivan de la región C del anticuerpo y, por tanto, no contribuyen al análisis de los fragmentos de péptidos que contienen CDR. Por tanto, el tiempo de la proteolisis con proteasa se ajustó a 6 hr para realizar el siguiente estudio.

Experimento 4: Proteolisis con tripsina y espectrometría de masas del trastuzumab

Se preparó un cuerpo poroso con anticuerpo inmovilizado empleando Herceptin en lugar de IgG como anticuerpo, y se sometió a una proteolisis con tripsina bajo la condición seleccionada en los experimentos 2 y 3, es decir, bajo la condición en la que la cantidad de micropartículas con proteasa inmovilizada por 100 µg de la cantidad de anticuerpo sobre la fase sólida es de 10 µg y el tiempo de proteolisis es de 6 horas. Después se realizó la espectrometría de masas y se realizó un análisis de base de datos (servidor Mascot) basándose en el resultado de la espectrometría de masas. Tal como puede observarse en la figura 7, se identificó Herceptin (Estructuras de rayos X de la cadena B de dominios de unión al antígeno de tres variantes del anticuerpo 4d5 anti-P185-Her2 humanizado y comparación con la formación de modelos moleculares) con una puntuación muy alta.

Para confirmar que los fragmentos de péptidos de Herceptin fueron detectados por la espectrometría de masas, se realizó un análisis más detallado en este experimento. La figura 8 muestra el espectro de masas resultante (MALDI-TOFMS).

Además, el sobrenadante resultante después de la proteolisis se analizó mediante LC-MS (cromatografía líquida de resolución ultraalta de cuadrupolo triplo LCMS-8080-MS, SHIMADZU CORPORATION). La figura 9 muestra el cromatograma de LC-MS resultante, y la figura 10 muestra los espectros de MS resultantes. La medición de LC-MS se realizó empleando una muestra preparada añadiendo ácido fórmico al sobrenadante hasta una concentración final de 0,5%, y la LC se realizó con las siguientes condiciones.

#### *Disoluciones de HPLC*

- Disolución A: ácido fórmico al 0,1%, disolución acuosa/acetonitrilo al 1%
- Disolución B: ácido fórmico al 0,1%, disolución de acetonitrilo

#### *Columna*

- ShimPack ODS XR-ODS II (diámetro interno: 2 mm, longitud de columna: 50 mm)
- Temperatura de la columna: 40 °C
- Caudal: 0,4 ml/min
- Cantidad de inyección: 20 µl

#### *Programa de gradiente*

0-2 min: %B = 0

2-10 min: %B = gradiente 0-40

10-11 min: %B = gradiente 40-98

11-13 min: %B = 98

13-13,5 min: %B = gradiente 98-0

5 13,5-15 min: %B = 0

Las secuencias de péptidos subrayadas en la cadena pesada (figura 11(A), SEQ ID NO:1 en el listado de secuencias) y en la cadena ligera (figura 11(B), SEQ ID NO:2 en el listado de secuencias) del trastuzumab fueron detectadas e identificadas mediante la anterior espectrometría de masas. Tal como puede observarse en la figura 11(A), se detectaron la CDR1 (SEQ ID NO:3 en el listado de secuencias), CDR2 (SEQ ID NO:4 en el listado de secuencias) y CDR3 (SEQ ID NO:5 en el listado de secuencias) de la cadena pesada. Además, tal como se muestra en la figura FIG. 11(B), se detectaron la CDR1 (SEQ ID NO:6 en el listado de secuencias) y CDR2 (SEQ ID NO:7 en el listado de secuencias) de la cadena ligera. Un fragmento tríptico que contiene la secuencia de CDR3 (SEQ ID NO:8 en el listado de secuencias) de la cadena ligera tiene una longitud de 4 restos aminoácidos o 37 restos aminoácidos y, por tanto, no resulta adecuado para la espectrometría de masas. Esta es la razón por la cual no pudo identificarse la CDR3 de la cadena ligera. Sin embargo, se considera que puede prepararse un fragmento de péptido que permita detectar la CDR3 de la cadena ligera mediante espectrometría de masas cambiando el tipo de proteasa utilizada. Además, en este experimento, se detectaron 5 del total de 6 CDR de las cadena pesada y ligera, aunque la CDR3 de la cadena ligera no pudo detectarse. Por tanto, tal como se muestra en la figura 7, se identificó el trastuzumab mediante un análisis de base de datos.

20 Tal como puede observarse de lo anterior, puesto que los fragmentos de péptidos preparados mediante el método según la presente invención son fragmentos de péptidos obtenidos mediante una proteólisis con proteasas selectiva de sitio del anticuerpo, el anticuerpo puede identificarse mediante una medición con espectrometría de masas sin tener que ajustar unas condiciones de medición complicadas.

Experimento 5: Estudio de una proteólisis con proteasas mixta

25 Para estudiar la aplicabilidad de la proteólisis con proteasas mixta a un sistema según la presente invención, el experimento de proteólisis con proteasas se realizó empleando tripsina y lisil endopeptidasa (Lys-C) en combinación.

Un anticuerpo (IgG o Herceptin) se sometió a una proteólisis con proteasas de la misma manera que en cada uno de los anteriores ejemplos experimentales agitando un cuerpo poroso con anticuerpo inmovilizado que presenta 100 µg del anticuerpo inmovilizado sobre la proteína G unido a él, y micropartículas que presentan 10 µg de proteasa inmovilizada sobre ellas, a 37 °C durante 6 horas. El experimento se realizó para ambos casos en que se utilizó IgG como anticuerpo y en que se empleó Herceptin como anticuerpo, bajo la condición en la que la proporción (proporción en peso) entre la tripsina y la lisil endopeptidasa fue ajustada a (1) 10:0, (2) 9:1, (3) 8:2, y (4) 0:10. El sobrenadante resultante después de la proteólisis y el componente inmovilizado sobre la superficie del cuerpo poroso se analizaron mediante electroforesis de SDS-PAGE. Los patrones electroforéticos resultantes se muestran en la figura 12. En la figura 12, el carril más a la izquierda es un marcador de peso molecular.

Los sobrenadantes después de la proteólisis de los niveles 1 a 4 obtenidos cuando Herceptin se emplea como anticuerpo se sometieron a una espectrometría de masas de la misma forma en el anterior experimento 2. Los espectros de MS resultantes se muestran en la figura 13. Además, se realizó un análisis de base de datos por el servidor Mascot de la misma manera que en el experimento 4 basándose en el resultado de la espectrometría de masas. El resultado del análisis de la base de datos del nivel 1 (tripsina al 100%) fue el mismo que el obtenido en el anterior experimento 4 (figuras 7 y 8). Los resultados del análisis de la base de datos de los niveles 2 a 4 fueron los siguientes (los datos no se muestran).

Nivel 2: Tripsina:lisil endopeptidasa = 90:10

Mezcla:

45 - gi |442924 Masa: 23708 Puntuación: 117 Esperado: 4,9e-007 Coincidencias: 13, Estructuras de rayos X de la cadena B de dominios de unión al antígeno de tres variantes del anticuerpo 4d5 anti-P185-Her2 humanizado y comparación con la formación de modelos moleculares

- gi |184747 Masa: 36012 Puntuación: 64 Esperado: 0,11 Coincidencias: 10, región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma-1 [*Homo sapiens*]

50 Nivel 3: Tripsina:lisil endopeptidasa = 80:20

Mezcla:

- gi |442924 Masa: 23708 Puntuación: 115 Esperado: 7,8e-007 Coincidencias: 13,

Estructuras de rayos X de la cadena B de dominios de unión al antígeno de tres variantes del anticuerpo 4d5 anti-P185-Her2 humanizado y comparación con la formación de modelos moleculares

- gi |184747 Masa: 36012 Puntuación: 54 Esperado: 1,1 Coincidencias: 9, región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma-1 [*Homo sapiens*]

5 Nivel 4: lisil endopeptidasa al 100%

- gi |184747 Masa: 36012 Puntuación: 71 Esperado: 0,021 Coincidencias: 8, región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma-1 [*Homo sapiens*]

10 En los casos de los niveles 2 y 3 en los que se emplearon la tripsina y la lisil endopeptidasa en combinación, el resultado del análisis muestra que se detectó la región constante de un anticuerpo procedente de humano, así como la región de unión al antígeno de Herceptin. En el caso del nivel 4, en el que se empleó la lisil endopeptidasa sola, el resultado del análisis muestra que no se detectó Herceptin y que solo se detectó predominantemente la región constante de un anticuerpo.

15 Tal como puede observarse a partir de los patrones electroforéticos mostrados en la figura 12, existe una tendencia de que, a medida que aumenta la proporción de lisil endopeptidasa, también aumenta el número de fragmentos de péptidos en el sobrenadante y las áreas de las bandas, es decir, aumenta la eficacia de la proteólisis y la tasa de recuperación de péptidos. Además, tal como se muestra en la figura 13, los tipos o las cantidades de fragmentos de péptidos detectados aumentan a medida que aumenta la proporción de lisil endopeptidasa. Sin embargo, la mayoría de los fragmentos de péptidos recién detectados en el caso de los niveles 2 a 4 proceden del dominio Fc de Herceptin, de lo cual se descubrió que la selectividad de sitio de la proteólisis con proteasas (es decir, la propiedad de proteolizar selectivamente el dominio Fab) se reduce.

20 Tal como puede observarse a partir de estos resultados, a medida que aumenta la cantidad de lisil endopeptidasa utilizada, aumenta la eficacia de proteólisis del anticuerpo, pero se reduce la selectividad de sitio de la proteólisis con proteasas y, por tanto, se reduce la cantidad de producción relativa de fragmentos de péptidos a partir de la región V a medida que aumenta la cantidad de producción de fragmentos de péptidos a partir de la región constante, de modo que la precisión de la detección y la identificación del anticuerpo tiende a reducirse. Por tanto, desde el punto de vista de proteolizar de modo selectivo de sitio la región Fab del anticuerpo y de detectar específicamente CDR mediante el método según la presente invención, la tripsina se emplea preferiblemente por sí sola. Cuando la tripsina y la lisil endopeptidasa se emplean en combinación, la cantidad de lisil endopeptidasa mezclada es preferiblemente de 10% o menor.

25 Debe advertirse que no se realizó la proteólisis selectiva de sitio en el caso del nivel 4 empleando lisil endopeptidasa por sí sola, mientras que las CDR fueron detectadas con eficacia mediante el análisis de la base de datos en el caso del nivel 1 (experimento 4) empleando solo tripsina, a partir de lo cual se descubrió que la región V del dominio Fab fue sometida a una proteólisis con proteasa selectiva. Puede decirse que los anteriores resultados demuestran que cuando la proteína sustrato es un anticuerpo, el acceso estérico de la proteasa al anticuerpo fue controlado de modo apropiado aplicando la presente invención utilizando tripsina, de modo que puede lograr la proteólisis con proteasas selectiva de sitio.

30 Además, este experimento demuestra que cuando la tripsina y la lisil endopeptidasa se emplean en combinación, cada una de las proteasas no pierde su función y puede proteolizar la proteína sustrato inmovilizada en los poros. Un anticuerpo tiene una región V en el extremo de su molécula y, por tanto, cuando la cantidad de lisil endopeptidasa usada aumenta, la selectividad de sitio tiende a reducirse. Sin embargo, se ha sugerido que, en el caso en que se emplee otra proteína como sustrato, existe la posibilidad de que la selectividad de sitio o la eficacia de la proteólisis mejore empleando una combinación de proteasas.

35 Tal como puede observarse a partir de los anteriores ejemplos experimentales, según la presente invención, puede obtenerse una muestra de fragmentos de péptidos sometiendo una proteína, tal como un anticuerpo, a una proteólisis con proteasas selectiva de sitio por medio de un método simple, y la muestra de fragmentos de péptidos obtenida resulta adecuada para la identificación o la detección de la proteína mediante espectrometría de masas.

Descripción de los signos de referencia

10: micropartícula

11: espaciador

50 15: proteasa

20: cuerpo poroso

21: molécula conectora

25: proteína sustrato

29: poro

110: micropartícula

120: membrana porosa

131: suspensión de micropartículas

5 132: columna de centrifugación

135: recipiente interno

136: recipiente externo

**Lista de secuencias**

<110> SHIMADZU CORPORATION

10 <120> Método para preparar fragmentos de péptidos, kit para preparar fragmentos de péptidos que se van a emplear en el mismo y método de análisis

<130> S12838EU - py

<140> EP 13 893 016.9

<141> 09.09.2013

15 <160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 223

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Trastuzumab (recombinación genética)

<400> 1

ES 2 649 147 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

<210> 2

5 <211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Trastuzumab (recombinación genética)

10 <400> 2

ES 2 649 147 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

- 5 <210> 3
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Trastuzumab (recombinación genética)

- 10 <400> 3
- Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg  
1 5 10

<210> 4  
<211> 14  
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Trastuzumab (recombinación genética)

<400> 4  
 Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr  
 5 1 5 10

<210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Trastuzumab (recombinación genética)

<400> 5  
 Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
 1 5 10 15

15 Gly

<210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Trastuzumab (recombinación genética)

<400> 6  
 Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln  
 1 5 10

25 <210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Trastuzumab (recombinación genética)

30 <400> 7  
 Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Trastuzumab (recombinación genética)

<400> 8  
 Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 1 5 10 15

Lys Val Glu Ile  
 20

40

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para preparar fragmentos de péptidos, que comprende:
- una etapa de inmovilización del sustrato, para inmovilizar una proteína sustrato que se va proteolizar en los poros de un cuerpo poroso; y
- 5 una etapa de proteólisis, para proteolizar la proteína sustrato con una proteasa poniendo en contacto entre sí el cuerpo poroso que presenta la proteína sustrato inmovilizada sobre él y micropartículas que presentan la proteasa inmovilizada sobre su superficie, en un líquido, en el que
- el diámetro promedio de partícula de las micropartículas es mayor que el diámetro promedio de poro del cuerpo poroso.
- 10 2.- El método para preparar fragmentos de péptidos según la reivindicación 1, en el que en la etapa de inmovilización del sustrato, una región predeterminada de la proteína sustrato se inmoviliza sobre el cuerpo poroso, y una región de la proteína sustrato diferente de la región predeterminada se somete a una proteólisis con proteasas selectiva de sitio.
- 15 3.- El método para preparar fragmentos de péptidos según la reivindicación 1 o 2, en el que una molécula conectora capaz de una interacción específica de sitio con la proteína sustrato se inmoviliza en los poros del cuerpo poroso, y en la etapa de inmovilización del sustrato, la proteína sustrato se inmoviliza en los poros del cuerpo porosa a través de la molécula conectora.
- 20 4.- El método para preparar fragmentos de péptidos según la reivindicación 3, en el que después de la etapa de inmovilización del sustrato, una molécula en la que la molécula conectora se une a la proteína sustrato tiene un tamaño de 0,5 veces a 1,5 veces el diámetro de poro del cuerpo poroso.
- 5.- El método para preparar fragmentos de péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la superficie de las micropartículas se modifica con una molécula espaciadora capaz de unirse con la proteasa, y la proteasa se inmoviliza sobre la superficie de las micropartículas a través de la molécula espaciadora.
- 25 6.- El método para preparar fragmentos de péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína sustrato es un anticuerpo.
- 7.- El método para preparar fragmentos de péptidos según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 30 8.- El método para preparar fragmentos de péptidos según la reivindicación 6 o 7, en el que en la etapa de inmovilización del sustrato, un dominio Fc del anticuerpo se inmoviliza sobre el cuerpo poroso, y en la etapa de proteólisis, un dominio Fab del anticuerpo es proteolizado de modo selectivo de sitio por la proteasa.
- 9.- El método para preparar fragmentos de péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la proteasa es tripsina.
- 35 10.- El método para preparar fragmentos de péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el diámetro promedio de poro del cuerpo poroso es de 30 a 150 nm, y el diámetro promedio de partícula de las micropartículas es de 100 nm o mayor.
- 11.- Un kit para preparar fragmentos de péptidos para su uso en el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo dicho kit:
- un cuerpo poroso que tiene poros capaces de inmovilizar una proteína sustrato, y micropartículas capaces de inmovilizar una proteasa sobre su superficie, en el que
- 40 el diámetro promedio de partícula de las micropartículas es mayor que el diámetro de poro del cuerpo poroso.
- 12.- El kit para preparar fragmentos de péptidos según la reivindicación 11, en el que las micropartículas se proporcionan en un estado en el que la proteasa está inmovilizada sobre su superficie.
- 13.- Un método de análisis, que comprende la preparación de fragmentos de péptidos según un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y el análisis mediante una espectrometría de masas.
- 45 14.- El método de análisis según la reivindicación 13, en el que los fragmentos de péptidos que se van a analizar contienen al menos una parte de una secuencia de aminoácidos de una región determinante de la complementariedad de un anticuerpo.

FIG. 1

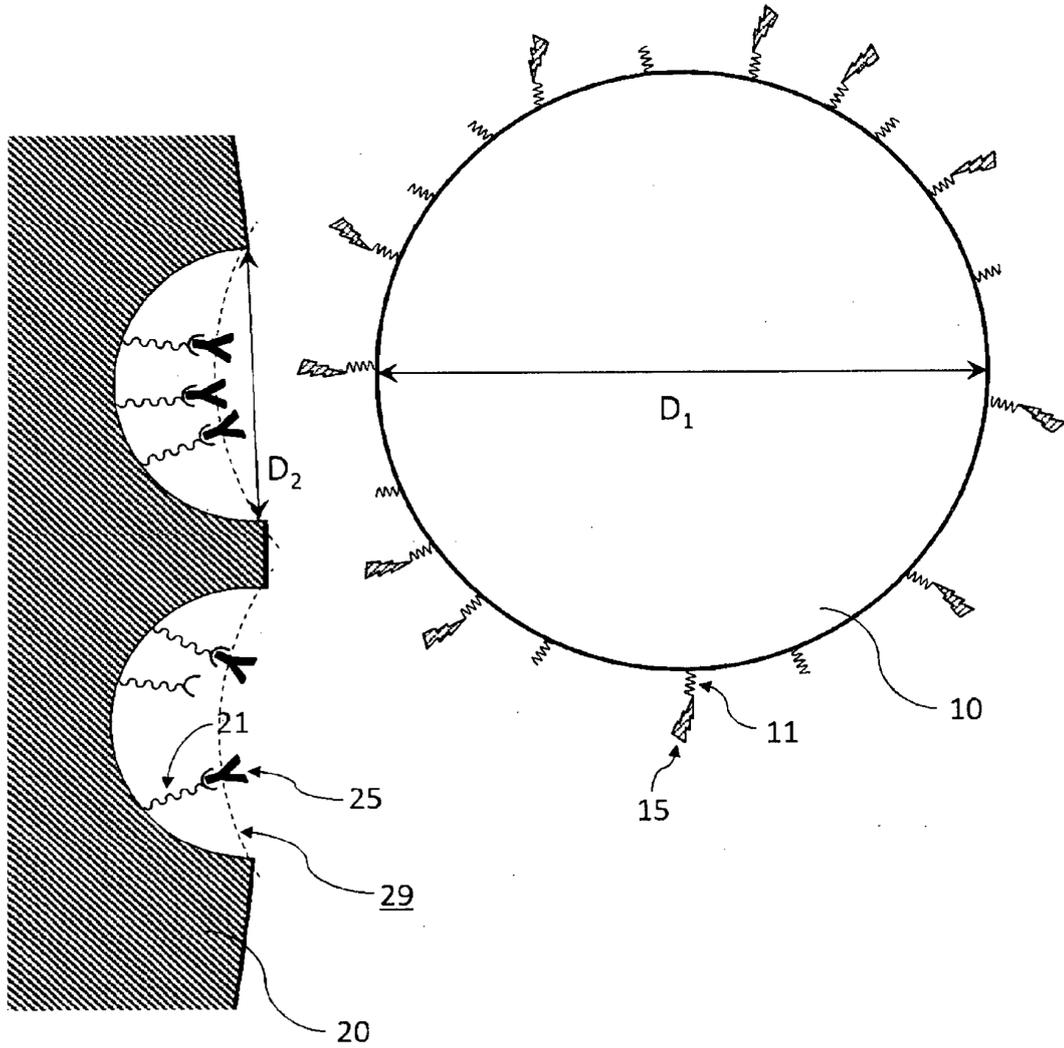


FIG. 2

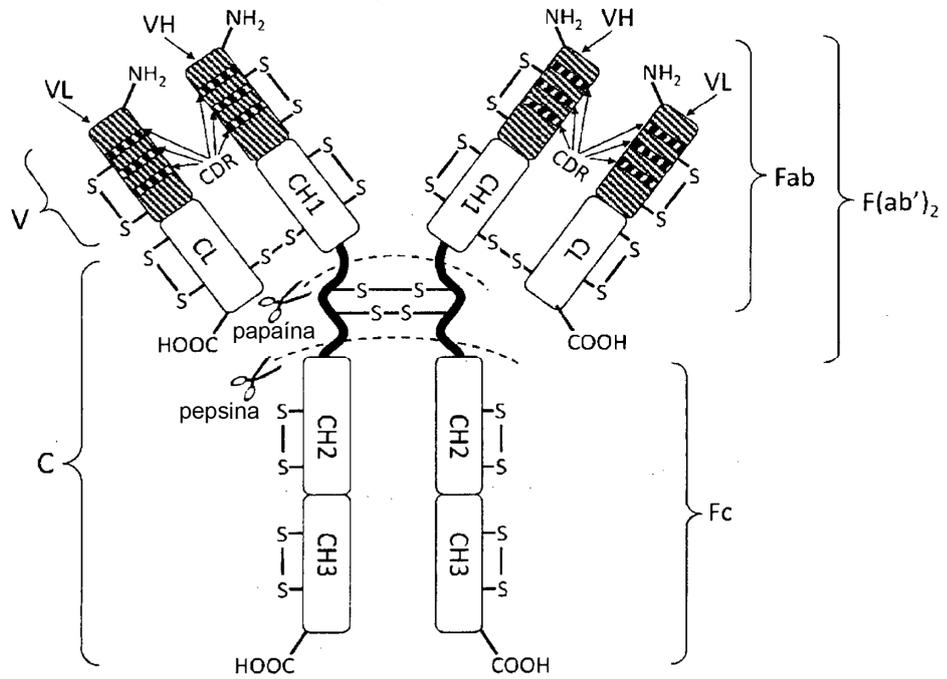


FIG. 3

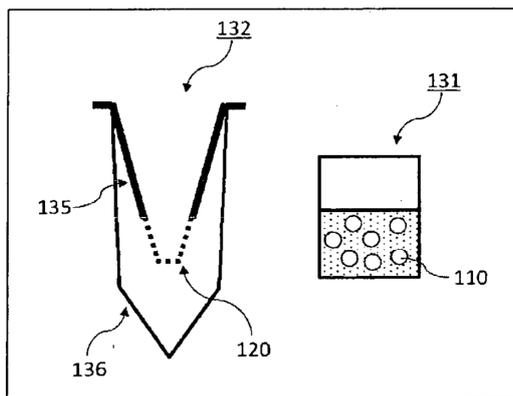
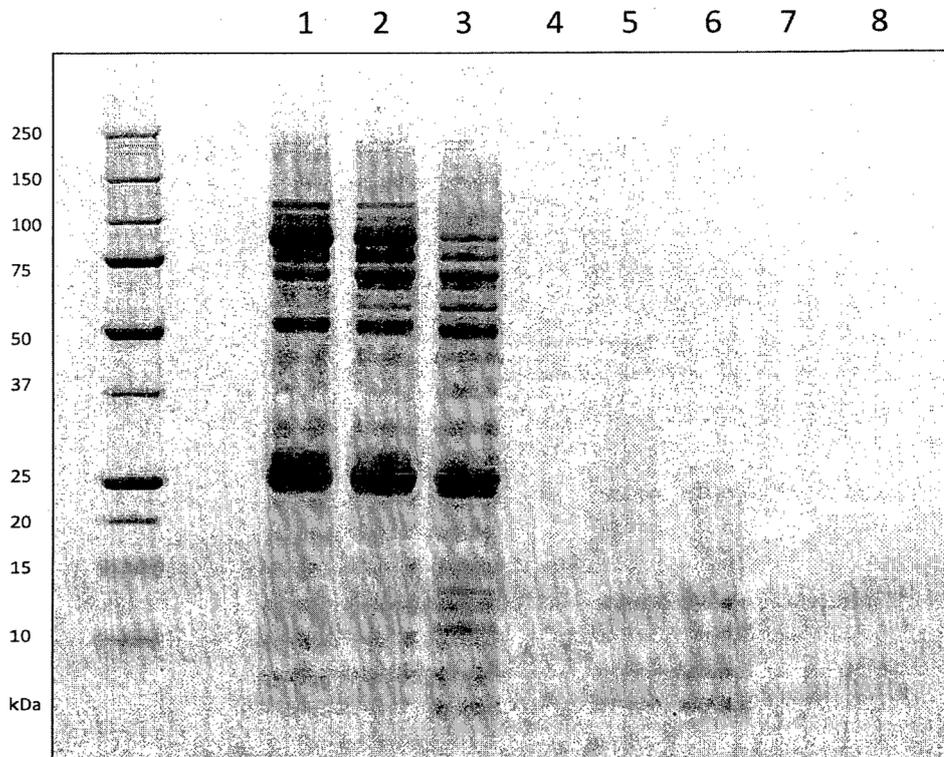


FIG. 4



1. Proteína G-IgG/esferas FG-tripsina, 5 µg
2. Proteína G-IgG/esferas FG-tripsina, 10 µg
3. Proteína G-IgG/esferas FG-tripsina, 25 µg
4. Proteína G/esferas FG-tripsina, 5 µg
5. Proteína G/esferas FG-tripsina, 10 µg
6. Proteína G/esferas FG-tripsina, 25 µg
7. Esferas FG-tripsina, 5 µg
8. Esferas FG-tripsina, 10 µg

FIG. 5

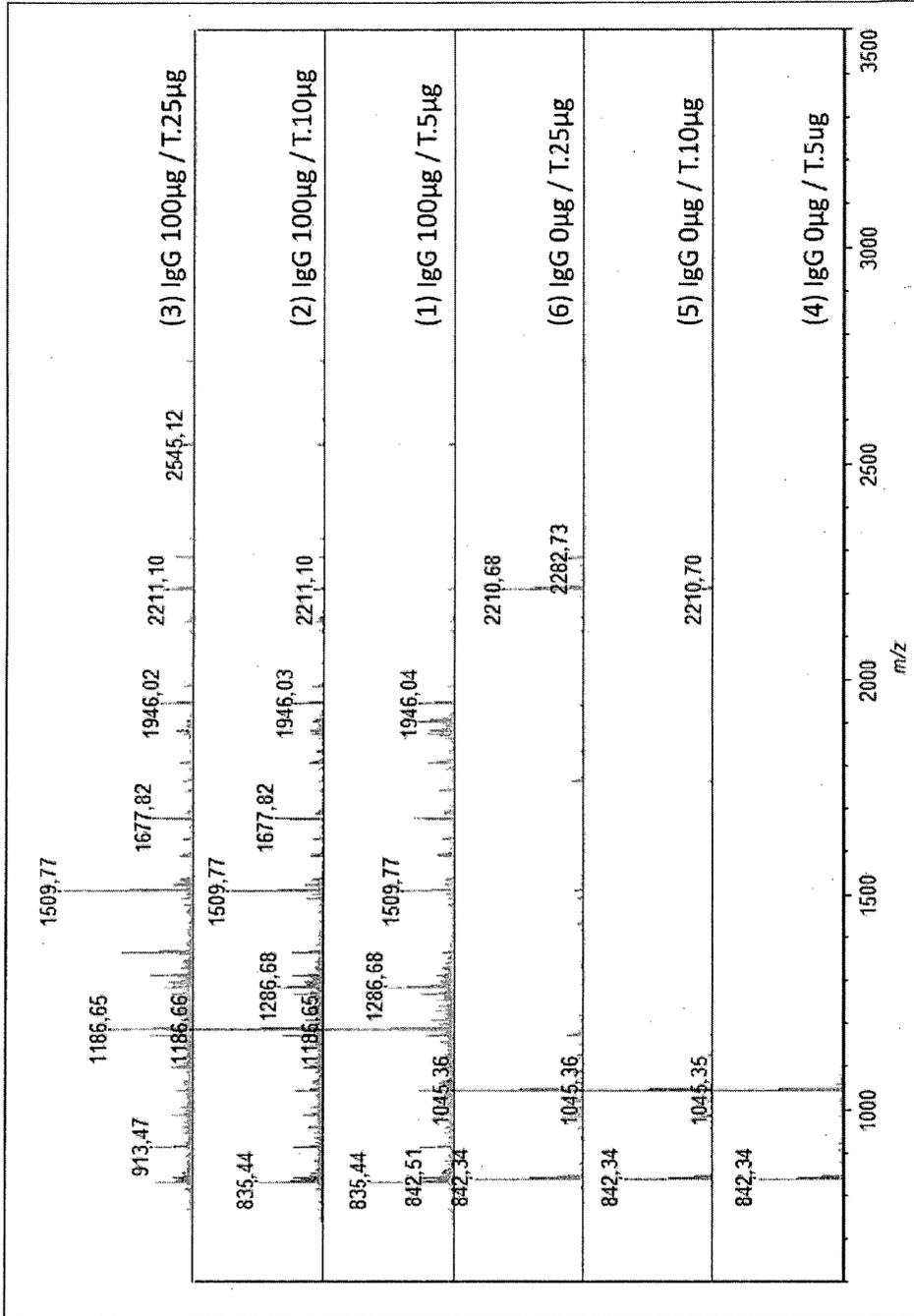


FIG. 6

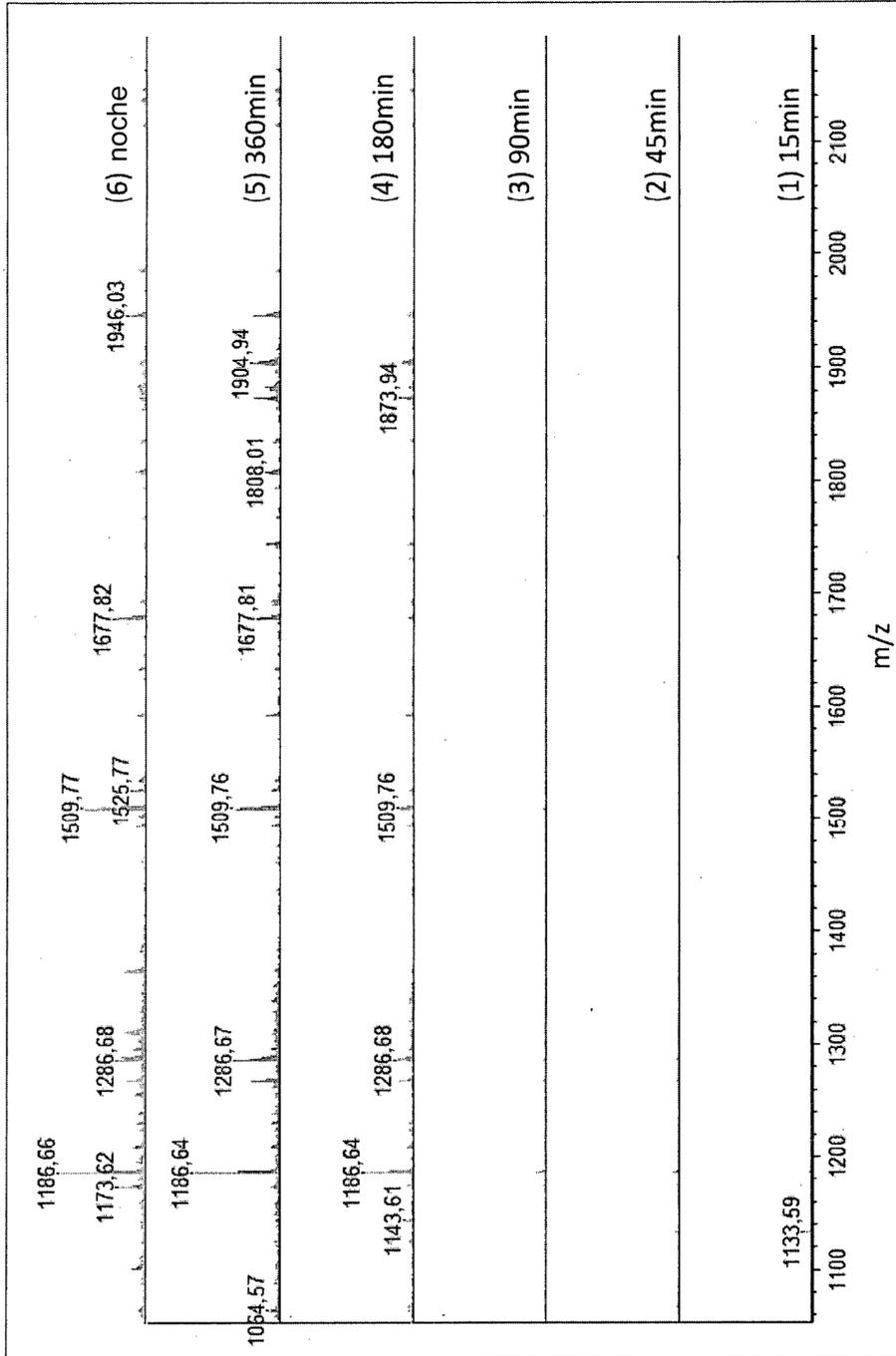


FIG. 7

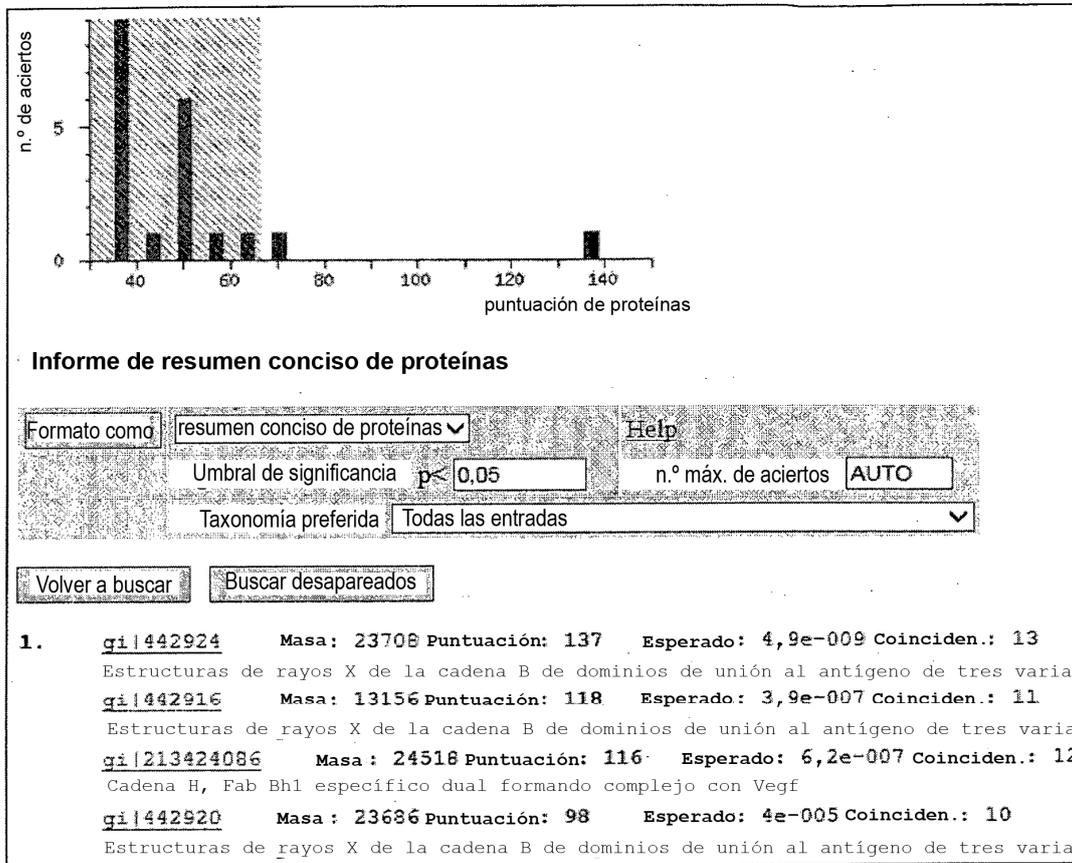


FIG. 8

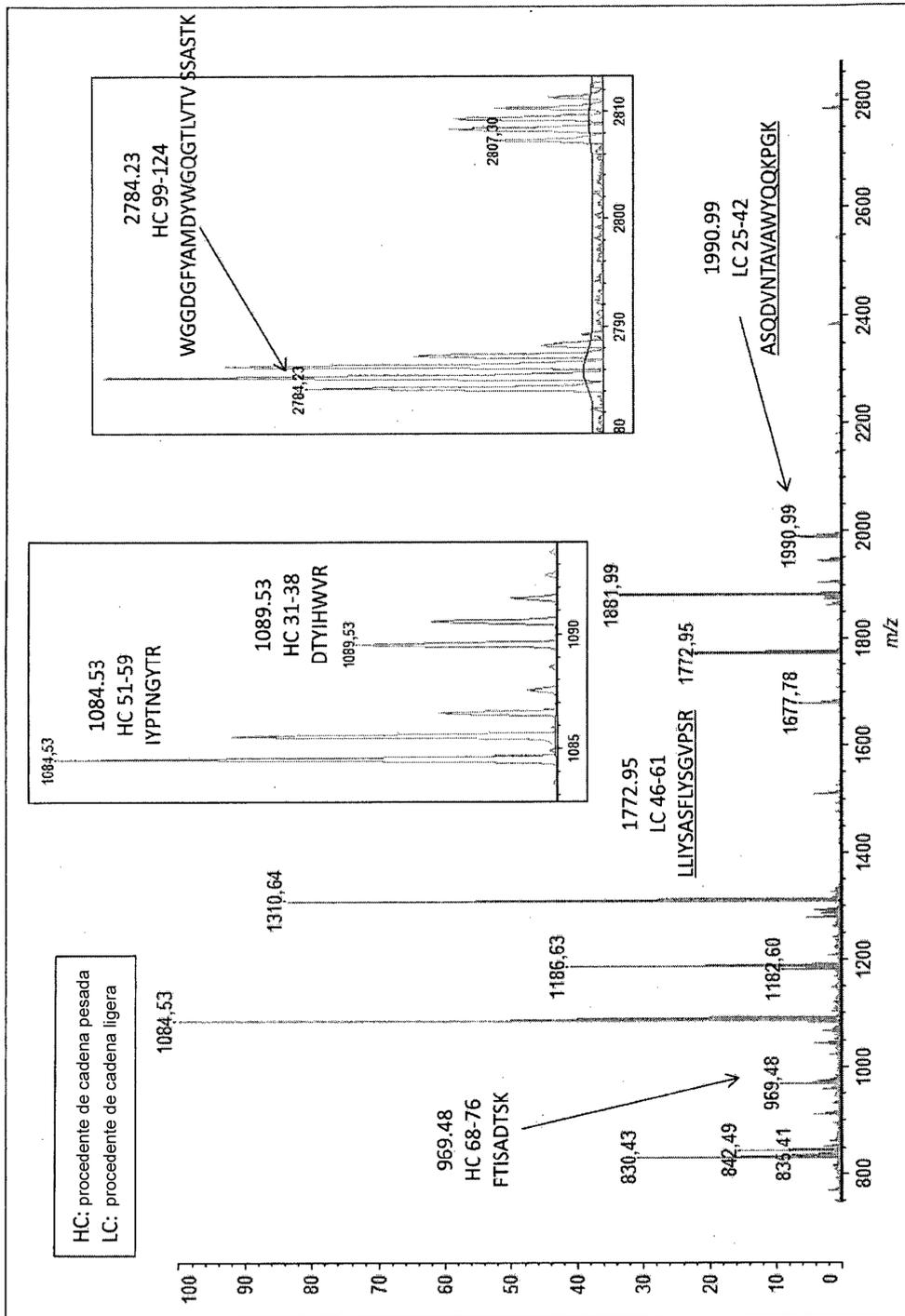


FIG. 9

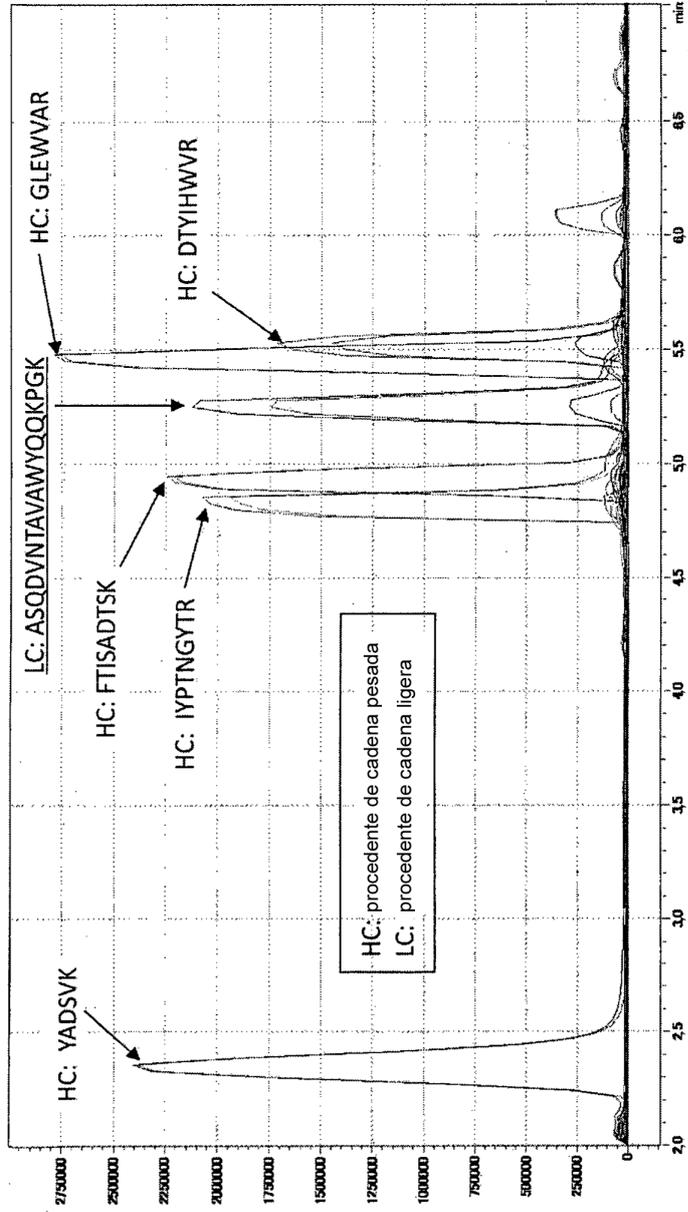


FIG. 10

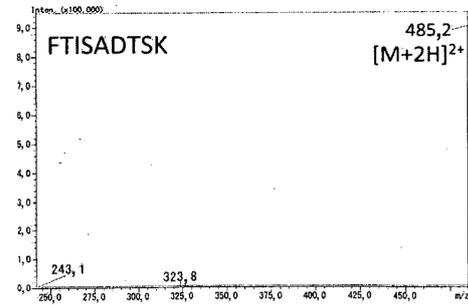
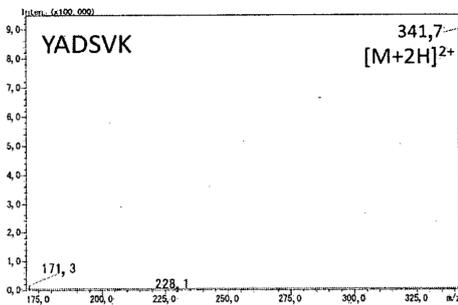
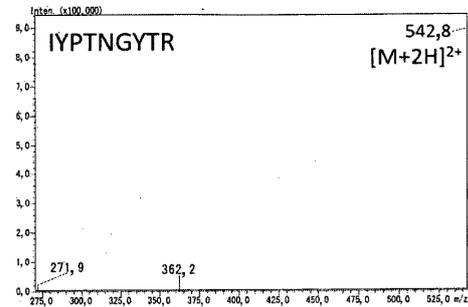
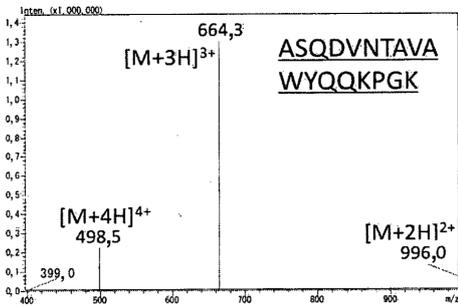
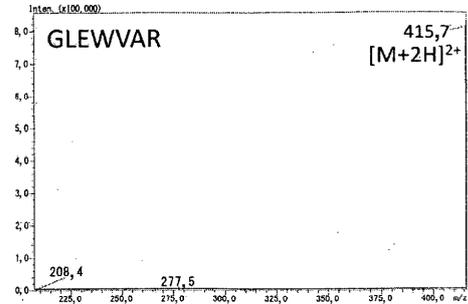
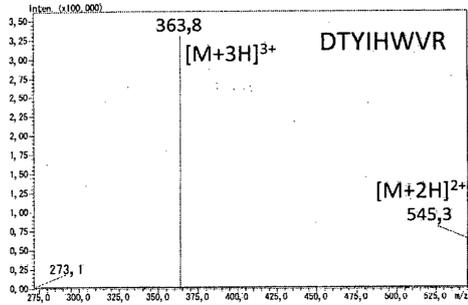


FIG. 11(A)

Cadena H de Herceptin

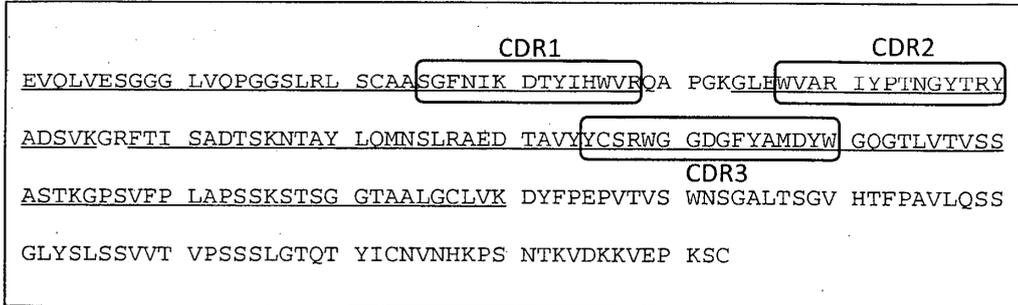


FIG. 11(B)

Cadena L de Herceptin

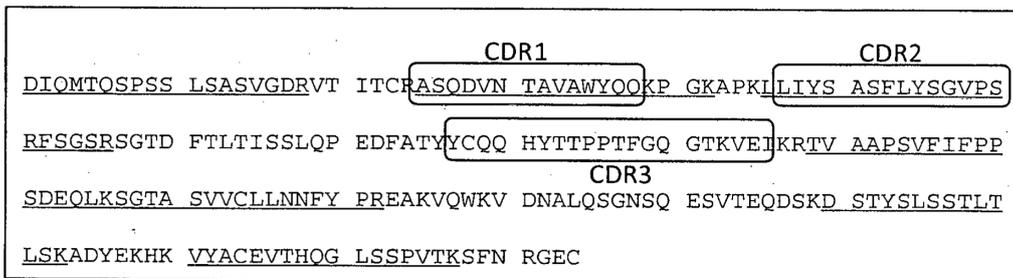


FIG. 12

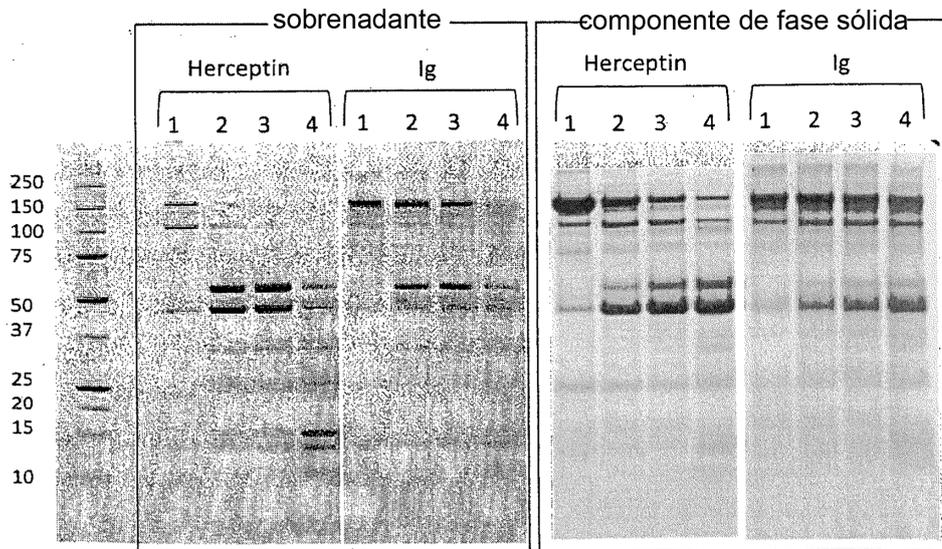


FIG. 13

