

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 138**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2012 PCT/US2012/038704**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12159084**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2012 E 12725954 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2710375**

54 Título: **Ensayos de actividad dependientes de modificación**

30 Prioridad:

18.05.2011 US 201161487612 P

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

18.07.2019

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Zählerweg 4

6300 Zug, CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

WEBER, ALFRED;

ENGELMAIER, ANDREA y

SCHWARZ, HANS, PETER

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 720 138 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

Ensayos de actividad dependientes de modificación

5 Reivindicación principal

Campo de la divulgación

10 En el presente documento se divulgan métodos, sistemas y kits que permiten ensayos de actividad dependientes de modificación.

Antecedentes de la divulgación

15 Varias enfermedades o trastornos están provocados por niveles inadecuados de un determinado polipéptido en el cuerpo o por la producción de versiones defectuosas de este polipéptido. Con la llegada de la ingeniería genética y la biología molecular, ahora es posible tratar tales enfermedades y trastornos mediante la terapia de polipéptidos de reemplazo. Por ejemplo, la administración de un polipéptido producido de manera recombinante puede tratar una enfermedad o un trastorno complementando los niveles bajos del polipéptido endógeno o sustituyendo uno defectuoso producido por el cuerpo.

20 Un factor crítico para el diseño de una terapia eficaz con polipéptidos recombinantes es aumentar la semivida en circulación del polipéptido una vez administrado al cuerpo. La cantidad de tiempo que un polipéptido permanece activo en el cuerpo puede extenderse, por ejemplo, modificando los polipéptidos usando una amplia variedad de grupos funcionales que aumentan la semivida del polipéptido. Tales modificaciones protegen el polipéptido frente a la degradación proteolítica, aumentan su estabilidad, potencian o facilitan su interacción con otra molécula, reducen su antigenicidad y/o disminuyen su tasa de aclaramiento del cuerpo. Las modificaciones a modo de ejemplo útiles para prolongar la semivida en circulación de un polipéptido recombinante administrado incluyen, sin limitación, pegilación, polisialilación, hesilación, silación y citrulinación.

30 Un aspecto importante del desarrollo de la terapia con polipéptidos recombinantes para enfermedades o trastornos es la capacidad para medir la actividad del polipéptido después de una modificación y/o administración a un individuo. Sin embargo, a menudo esta capacidad se ve obstaculizada por la presencia del polipéptido endógeno que interfiere en la especificidad y precisión de los ensayos usados para detectar la presencia o actividad del polipéptido recombinante. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos para evaluar la presencia y/o actividad de un polipéptido recombinante.

Antecedentes de la técnica

40 El documento WO 2009/086262 se refiere a métodos para detectar y cuantificar una proteína derivada de plasma y una proteína recombinante en una muestra basándose en la diferencia en la glicosilación de proteínas, cuando la proteína plasmática y la proteína recombinante son esencialmente iguales.

45 Koseoglu M.H. *et al.* se refieren al mecanismo de estimulación del transporte de glucosa en respuesta a la inhibición de la fosforilación oxidativa (Koseoglu *et al.* (2009) Molecular and Cellular Biochemistry, Vol. 194, NR. 1-2, págs. 109-116).

Su Y.C. *et al.* se refieren a la cuantificación sensible de los compuestos pegilados mediante anticuerpos monoclonales anti-poli(etilenglicol) de segunda generación (Su Y.C. *et al.* (2010) Bioconjugate Chem. 21, 1264-1270).

50 Sumario

En el presente documento se describen métodos, sistemas y kits, denominados ensayos de actividad dependientes de modificación (MDAA). Los MDAA utilizan un agente de captura que reconoce una modificación que se asocia selectivamente con polipéptidos que comprenden la modificación, incluso en presencia de polipéptidos endógenos, versiones no modificadas de los mismos o polipéptidos o polipéptidos similares que comprenden un patrón o grado de modificación diferente. La presencia o actividad de polipéptido capturado puede medirse entonces como una forma de detectar la presencia de polipéptidos que comprenden la modificación.

60 Algunos aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan métodos para detectar la presencia de un polipéptido recombinante que comprende una modificación. Los métodos pueden comprender las etapas de incubar una muestra que incluye el polipéptido recombinante que comprende la modificación con un agente de captura que se une selectivamente a la modificación en condiciones que permiten la unión selectiva del agente de captura a la modificación, formándose así un complejo polipéptido-agente; purificar el complejo polipéptido-agente de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del polipéptido recombinante, en el que la detección del polipéptido recombinante es indicativa de la presencia del polipéptido recombinante que comprende la modificación. Alternativa o concurrentemente, los métodos pueden someter a ensayo la actividad de un polipéptido, en el que la detección de

la actividad de polipéptido es indicativa de la presencia del polipéptido recombinante que comprende la modificación. Un polipéptido recombinante que comprende una modificación puede ser un polipéptido recombinante pegilado, polisialilado, hesilado o silado. Un gen de captura puede ser un anticuerpo, un aptámero, un péptido sintético, una molécula de unión y un ácido nucleico.

5 Otros aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan métodos para detectar la presencia de un factor de coagulación recombinante que comprende una modificación. Los métodos pueden comprender las etapas de incubación una muestra que incluye el factor de coagulación recombinante que comprende la modificación con un agente de captura que se une selectivamente a la modificación en condiciones que permiten la unión selectiva del agente de captura a la modificación, formándose así un complejo factor-agente; purificar el complejo factor-agente de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor de coagulación recombinante, en el que la detección del factor de coagulación recombinante es indicativa de la presencia del factor de coagulación recombinante que comprende la modificación. Alternativa o concurrentemente, los métodos pueden someter a ensayo la actividad de factor de coagulación, en el que la detección de la actividad de factor de coagulación es indicativa de la presencia del factor de coagulación recombinante que comprende la modificación. Un factor de coagulación que comprende una modificación puede ser un factor VII recombinante pegilado, un factor VII recombinante polisialilado, un factor VII hesilado, un factor VII recombinante silado, un factor VIII recombinante pegilado, un factor VIII recombinante polisialilado, un factor VIII recombinante hesilado, un factor VIII recombinante silado, un factor IX recombinante pegilado, un factor IX recombinante polisialilado, un factor IX hesilado y/o un factor IX recombinante silado.

25 Otros aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan kits que comprenden uno o más componentes útiles para poner en práctica los métodos divulgados en el presente documento e instrucciones para llevar a cabo los métodos. Un kit puede comprender uno o más agentes de captura divulgados en el presente documento, uno o más soportes de fase sólida y/o uno o más reactivos necesarios para detectar la presencia y/o una actividad de un polipéptido recombinante que comprende una modificación divulgada en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

30 La figura 1 muestra un gráfico de las curvas de concentración-respuesta de un MDAA para FVIII recombinante pegilado obtenido usando una preparación de FVIII pegilado y una preparación de plasma de referencia humano.

35 La figura 2 muestra un gráfico de las curvas de dosis-respuesta de un MDAA para FVIII recombinante pegilado en matrices de muestras con diferente complejidad (tampón frente a plasma).

La figura 3 muestra un gráfico de la curva de calibración media y la concordancia de los patrones de ensayo ajustados de manera inversa que demuestran la exactitud y la precisión de un MDAA para FVIII recombinante pegilado. Las barras de error marcan la desviación estándar individual de las medias.

40 La figura 4 muestra un gráfico que demuestra la especificidad de un MDAA para FVIII recombinante pegilado usando una competencia con PEG 5000.

45 La figura 5 muestra un gráfico que demuestra la especificidad de un MDAA para FVIII recombinante pegilado usando una competencia con anticuerpo anti-PEG.

La figura 6 muestra un gráfico de linealidad dilucional que demuestra la exactitud y la precisión de un MDAA para FVIII recombinante pegilado.

50 La figura 7 muestra un gráfico de la curva de concentración-respuesta de un MDAA para FVIII recombinante polisialilado usando una preparación de FVIII polisialilado en un intervalo de actividad de FVIII de 78 a 2,4 mUI/ml y la falta de respuesta de plasma humano que contiene FVIII no modificado.

55 La figura 8 muestra un gráfico de las curvas de concentración-respuesta de un MDAA para FVIII recombinante polisialilado usando FVIII recombinante polisialilado añadido en cantidades conocidas a plasma de diferentes especies animales en relación con lo determinado en tampón.

La figura 9 muestra un gráfico de las curvas de concentración-respuesta que demuestran el rendimiento y la sensibilidad de un MDAA para FVIII recombinante polisialilado.

60 La figura 10 muestra un gráfico de la curva de calibración media que demuestra la exactitud y la precisión de un MDAA para FVIII recombinante polisialilado.

65 La figura 11 muestra un gráfico de la concordancia de las concentraciones ajustadas de manera inversa con las nominales para los cinco calibradores de las curvas individuales, que ilustran que las concentraciones ajustadas de manera inversa estaban dentro de un intervalo de $\pm 10\%$ de las nominales en todo el intervalo.

La figura 12 muestra un gráfico del perfil farmacocinético obtenido con un MDAA para FVIII recombinante polisialilado administrado a ratas que contienen niveles normales de FVIII endógeno.

5 La figura 13 muestra un gráfico de la curva de calibración media que demuestra la exactitud y la precisión de un MDAA para FVIII recombinante polisialilado. La barra de error proporciona la desviación estándar individual de las medias.

10 La figura 14 muestra un gráfico que demuestra la especificidad de un MDAA para FVIII recombinante polisialilado usando una competencia con ácido polisialílico.

La figura 15 muestra un gráfico que demuestra la precisión de un MDAA para el FVIII recombinante polisialilado. El área resaltada proporciona el intervalo 2-SD de la media obtenida.

15 La figura 16 muestra un gráfico de curvas de dosis-respuesta en muestras de plasma animal que demuestran la exactitud y la precisión de un MDAA para FVIII recombinante polisialilado.

La figura 17 muestra un gráfico de las curvas de concentración-respuesta de un MDAA para FIX recombinante pegilado obtenido usando una preparación de FIX pegilado y una preparación de plasma de referencia humano.

20 La figura 18 muestra un gráfico de un MDAA para FVIII recombinante pegilado usando un formato de ensayo de coagulación.

25 La figura 19 muestra un gráfico de un MDAA para FVIII recombinante polisialilado usando un formato de ensayo de coagulación.

Descripción detallada

30 Un aspecto importante del desarrollo de compuestos de tratamiento para la hemofilia u otros trastornos es la capacidad para medir la actividad del compuesto de tratamiento tras una modificación y/o administración en el entorno de tratamiento que se produce de manera natural. Sin embargo, esta capacidad a menudo se ve obstaculizada por la presencia de compuestos similares en el entorno de tratamiento que interfieren en la especificidad y la precisión de los resultados de las pruebas de ensayo de actividad.

35 Se describen en el presente documento sistemas y métodos, denominados ensayos de actividad dependientes de modificación (MDAA) que permiten la separación y detección de polipéptidos recombinantes en presencia de versiones no modificadas de los mismos polipéptidos o similares, incluidos por ejemplo, los polipéptidos que se producen de manera natural o endógenos, producidos a partir del genoma del individuo que está tratándose. Como ejemplo no limitativo, en el desarrollo de tratamientos para la hemofilia, puede ser necesario medir la actividad de un compuesto de factor VIII recombinante pegilado tras la administración. Antes de que el compuesto se administre a humanos con deficiencia de factor VIII, a menudo se administra a animales de laboratorio que pueden o no ser deficientes en factor VIII. Sin los MDAA de la presente divulgación, no sería posible determinar si la presencia o actividad medida tras la administración se debió al factor VIII recombinante pegilado administrado o al factor VIII que se produce de manera natural. Los MDAA divulgados en el presente documento permiten tal distinción.

45 En realizaciones particulares, los MDAA de la presente divulgación comprenden un agente de captura unido a un soporte sólido. Una muestra de prueba puede incubarse con el soporte sólido donde el compuesto modificado se une selectivamente por el agente de captura inmovilizado. Todos los demás compuestos, incluidos en determinadas realizaciones, los compuestos endógenos no modificados pueden retirarse mediante lavado. Puede realizarse un ensayo de actividad con el compuesto modificado capturado.

50 Las etapas de los MDAA divulgados en el presente documento pueden incluir uno o más de: unir un anticuerpo a un soporte sólido; incubar una muestra en la superficie del soporte sólido; lavar el soporte sólido; y ejecutar un ensayo cromogénico sobre el soporte sólido. En una realización particular, los métodos solo incluyen la etapa de incubación, la etapa de lavado y/o la ejecución de la etapa de ensayo cromogénico. La etapa de unión puede incluir la unión de un anticuerpo a una placa a un pH neutro a ligeramente alcalino.

60 Algunos aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan un polipéptido recombinante. Un polipéptido recombinante es uno sintetizado usando técnicas de biología molecular. Cualquier polipéptido expresado de manera recombinante que comprende una modificación puede detectarse en los métodos divulgados en el presente documento. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido son un mimético químico artificial de un aminoácido que se produce de manera natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos que se producen de manera natural, los que contienen residuos modificados y polímeros de aminoácidos que no se producen de manera natural.

65 Normalmente, un polipéptido recombinante se expresa a partir de un polinucleótido recombinante introducido en una

célula adecuada para el cultivo. Habitualmente, el polinucleótido recombinante comprende un vector de expresión que incluye un marco de lectura abierto que codifica el polipéptido que va a expresarse, así como secuencias codificantes reguladoras especializadas involucradas en la replicación de ADN, la expresión de polipéptidos, la resistencia a antibióticos, la integración genómica, así como otras características. Por ejemplo, los vectores de expresión procariotas comprenden normalmente un origen de replicación, un promotor y/o elementos potenciadores adecuados, y también los sitios necesarios para la unión al ribosoma, la poliadenilación, la terminación transcripcional, así como las secuencias no transcritas flanqueantes en 5' y otros elementos genéticos no transcritos. Los vectores procariotas a modo de ejemplo incluyen pET y pRSET que usan promotores tales como, por ejemplo, un promotor de bacteriófago T7.

Los vectores de expresión eucariotas comprenden normalmente un origen de replicación, un promotor y/o elementos potenciadores adecuados, y también los sitios necesarios para la unión al ribosoma, poliadenilación, corte y empalme, terminación transcripcional, así como secuencias no transcritas flanqueantes en 5' y otros elementos genéticos no transcritos. Los ejemplos de vectores de levadura incluyen pAO, pMET, pPIC, pPICZ y pYES que usan promotores tales como, por ejemplo, AOX1, AUG1, GAP y GAL1. Los vectores de insectos a modo de ejemplo incluyen pAc5, pBAC, pIB, pMIB, pMT que usan promotores tales como, por ejemplo, PH, p10, MT, Ac5, OplE2, gp64 y polh. Los vectores de mamíferos a modo de ejemplo incluyen pBPV, pCMV, pCMVTNT, pDNA, pDisplay, pMSG, pOG44, pQBI25, pRc/RSV, pSECTag, pSECTag2, pSG, pSV2cat, pSVK3, pSVL, pUCIG-MET, pVAX1, pWLNco y pXT1, usando promotores tales como, por ejemplo, beta-caseína, beta-lactoglobulina, promotor de ácido de lactosuero, timidina cinasa de VHS, promotores temprano y tardío de virus del simio 40 (SV40), LTR de retrovirus y metalotioneína-1 de ratón. Los marcadores seleccionables incluyen ampicilina, cloranfenicol transferasa, kanamicina, neomicina y tetraciclina. Se conocen en la técnica vectores de expresión adecuados y están disponibles comercialmente.

Las células de insecto y las líneas celulares derivadas de insectos incluyen células de, por ejemplo, *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster* y *Manduca sexta*. Los ejemplos no limitativos de líneas celulares de insectos incluyen High-Five, Kc, línea 2 de *Drosophila* de Schneider (S2), SF9 y SF21. Las células de mamíferos y las líneas celulares derivadas de células de mamíferos incluyen células de, por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres, animales porcinos, bovinos, equinos, primates y humanos. Los ejemplos no limitativos de líneas celulares de mamíferos incluyen las líneas celulares 1A3, 3T3, 6E6, 10T1/2, APRT, BALB/3T3, BE (2)-C, BHK, BT, C6, C127, CHO, CHP3, COS-1, COS-7, CPAE, ESK-4, FB2, GH1, GH3, HeLa, HEK-293, HepG2, HL-60, IMR-32, L2, LLC-PK1, L-M, MCF-7, NB4, NBL-6, NCTC, Neuro 2A, NIE-115, NG108-15, NIH3T3, PC12, PK15, SBAC, SH-SY5Y, SK-Hep, SK-N-DZ, SK-N-F1, SK-N-SH, ST, SW-13 y VV-1. Las líneas celulares se pueden obtener de la Colección Americana de Cultivos Tipo, la Colección Europea de Cultivos Tipo y/o la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Tipo.

Pueden emplearse diversos sistemas de expresión procariotas y/o eucariotas para expresar de manera recombinante una proteína divulgada en el presente documento. Los sistemas de expresión pueden incluir cualquiera de una variedad de características que incluyen, sin limitación, expresión inducible, expresión no inducible, expresión constitutiva, expresión específica de tejido, expresión específica de célula, expresión mediada por virus, expresión integrada de manera estable y expresión transitoria. Se conoce en la técnica cómo producir y usar tales sistemas de expresión.

Un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento es normalmente un polipéptido terapéutico. Los ejemplos no limitativos de un polipéptido terapéutico incluyen factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF), proteasa ADAMTS 13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón α (IFN- α), interferón de consenso, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoyetina (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, polipéptido similar a angiopoyetina 1 (ANGPTL1), polipéptido similar a angiopoyetina 2 (ANGPTL2), polipéptido similar a angiopoyetina 3 (ANGPTL3), polipéptido similar a angiopoyetina 4 (ANGPTL4), polipéptido similar a angiopoyetina 5 (ANGPTL5), polipéptido similar a angiopoyetina 6 (ANGPTL6), polipéptido similar a angiopoyetina 7 (ANGPTL7), vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína morfogénica ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea 8, proteína morfogénica ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica ósea 15, receptor IA de proteína morfogénica ósea, receptor IB de proteína morfogénica ósea, receptor II de proteína morfogénica ósea, factor neurotrófico derivado del cerebro, cardiotrofina 1, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 1, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 α , factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 β , factor de crecimiento de células endoteliales β , endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, epigen, epirregulina, agente atrayente de neutrófilos derivado del epitelio, factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de crecimiento de fibroblastos 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8, factor de crecimiento de fibroblastos 8b,

- factor de crecimiento de fibroblastos 8c, factor de crecimiento de fibroblastos 9, factor de crecimiento de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos 11, factor de crecimiento de fibroblastos 12, factor de crecimiento de fibroblastos 13, factor de crecimiento de fibroblastos 16, factor de crecimiento de fibroblastos 17, factor de crecimiento de fibroblastos 19, factor de crecimiento de fibroblastos 20, factor de crecimiento de fibroblastos 21,
- 5 factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor α 1 de factor neurotrófico derivado de línea celular glial, receptor α 2 de factor neurotrófico derivado de línea celular glial, proteína relacionada con el crecimiento, proteína relacionada con el crecimiento α , proteína relacionada con el crecimiento β , proteína relacionada con el crecimiento γ , factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor de crecimiento similar a insulina I, receptor del factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento similar a insulina II, proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor del factor inhibidor de leucemia α , factor de crecimiento nervioso, receptor del factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina 3, neurotrofina 4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento placentario 2, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, factor de crecimiento derivado de plaquetas AB, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas α , receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas β , factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor del factor de células del tallo, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento transformante β 1, factor de crecimiento transformante β 1.2, factor de crecimiento transformante β 2, factor de crecimiento transformante β 3, factor de crecimiento transformante β 5, factor de crecimiento transformante latente β 1, proteína I de unión a factor de crecimiento transformante β , proteína II de unión a factor de crecimiento transformante β , proteína III de unión a factor de crecimiento transformante β , linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor tipo I del factor de necrosis tumoral, receptor tipo II del factor de necrosis tumoral, receptor del activador del plasminógeno de tipo urocinasa, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, lectina, ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del folículo, hormona estimulante de la tiroides, activador del plasminógeno tisular, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuína, hormona leutinizante, estrógeno, insulina, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombopoyetina, urocinasa, integrina, trombina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept) o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo del mismo. Otros polipéptidos terapéuticos se describen en la tabla 1 de Siekmann, *et al.*, Nucleophilic Catalysts for Oxime Linkage, documento US 2012/0035344, que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.
- 20
- 25
- 30
- 35 Un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento incluye, sin limitación, un factor de crecimiento, una citocina, un agente inmunomodulador, una hormona, un anticuerpo, una enzima, un inhibidor enzimático, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una esterasa, una transferasa, una oxidorreductasa, una hidrolasa, una asparaginasa, una adenosina desaminasa, una neurotoxina, una proteína hepática, una proteína pancreática, una proteína muscular, una proteína cerebral, una proteína pulmonar y una proteína sanguínea.
- 40
- En aspectos de esta realización, una esterasa puede incluir, sin limitación, una butirilcolinesterasa o una acetilcolinesterasa.
- 45
- En aspectos de esta realización, una citocina puede incluir, sin limitación, una quimiocina, una linfocina, un factor de necrosis tumoral, un factor hematopoyético como un factor estimulante de colonias de granulocitos y un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
- 50
- En aspectos de esta realización, un agente inmunomodulador puede incluir, sin limitación, una interleucina y un interferón.
- 55
- En aspectos de esta realización, una proteína sanguínea puede ser un agente estimulante de la eritropoyesis, incluyendo, sin limitación, una eritropoyetina, una eritropoetina, una eritropoyetina y una darbepoetina.
- 60
- En aspectos de esta realización, una proteína sanguínea puede incluir, sin limitación, ADAMTS-13, α 1-antiplasmina, α 2-antiplasmina, antitrombina, antitrombina III, procoagulante del cáncer, eritropoyetina, factor II, factor IIa, factor V, factor Va, factor VI, factor VIa, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, fibronectina, fibrinógeno (factor I), cofactor II de heparina, cininógeno de alto peso molecular (HMWK), inmunoglobulina intramuscular, inmunoglobulina intravenosa, plasmina, plasminógeno, inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI1), inhibidor 2 del activador del plasminógeno (PAI2), precalicreína, prostaciclina, proteína C, proteína C activa (APC), proteína S, proteína Z, inhibidor de proteasa relacionada con la proteína Z, trombomodulina, factor tisular (factor III), inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), activador del plasminógeno tisular (t-PA), urocinasa y factor de Von Willebrand.
- 65
- En aspectos de esta realización, una proteína sanguínea puede ser una proteína de coagulación sanguínea, que incluye tanto sus formas inactivas como activas. Un factor de coagulación sanguínea se refiere a los factores de la

ruta de coagulación sanguínea que comprenden componentes en las rutas de coagulación intrínsecas, extrínsecas y comunes. El término abarca tales factores ya estén presentes en una muestra como componentes endógenos (es decir, que son inherentes a la muestra de sangre), o se hayan añadido como factores exógenos. También pueden incluirse fosfolípido(s) como factores de coagulación cuando se añaden en un método que utiliza cualquiera de las rutas intrínsecas, extrínsecas o comunes para la activación de la coagulación. En aspectos de esta realización, una proteína sanguínea puede ser un factor de coagulación sanguínea, incluyendo, sin limitación, el factor II, el factor VII, el factor VIII, el factor IX y el factor X.

En aspectos de esta realización, una proteína sanguínea puede ser un inhibidor de proteasa, incluyendo, sin limitación, α 1-antitripsina, α 1-antiquimototripsina, inhibidor de C1 y α 2-antiplasmina, antitrombina.

En aspectos de esta realización, una proteína sanguínea puede ser una proteasa, incluyendo, sin limitación, tripsina, quimotripsina, elastasa, pepsina y ADAMTS13.

Algunos aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan una modificación. Una modificación divulgada en el presente documento es una asociada con un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. Puede usarse cualquier modificación que tenga un sitio o resto de unión para el que un agente de captura pueda unirse selectivamente en los métodos divulgados en el presente documento. Como tal, cualquier modificación para la que exista un agente de captura que se produce de manera natural o para la que pueda prepararse un agente de captura sería útil en los métodos divulgados en el presente documento. Una modificación divulgada en el presente documento incluye una que se produce durante o después de la expresión del polipéptido recombinante divulgado en el presente documento.

En una realización, una modificación puede ser una modificación postraducciona. Una modificación postraducciona es una modificación química de un polipéptido, normalmente uniendo un grupo funcional bioquímico a un aminoácido del polipéptido. Un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento puede modificarse uniendo el polipéptido a cualquiera de estos grupos funcionales bioquímicos, según lo entiende un experto en la materia, la modificación particular del polipéptido que va a capturarse.

Los ejemplos de una modificación incluyen, sin limitación, un grupo acetato, un grupo fosfato, un grupo de lípido o un grupo de hidrato de carbono, un grupo miristato, un grupo palmitato, un grupo isoprenoide como un grupo farnesol y un grupo geranilgeraniol, un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI), un grupo lipoato, un grupo flavina, un grupo hemo C, un grupo 4'-fosfopanteteinilo, un grupo retinilideno, un grupo diftamida, un grupo etanolamina-fosfoglicerol, un grupo hipusina, un grupo acetilo, un grupo formilo, un grupo alquilo, un grupo metilo, un grupo de amida, un aminoácido, un grupo butilo, un grupo carboxilo, un grupo glicosilo, un grupo ácido polisialílico (PSA), un grupo hidroxilo, un grupo malonilo, un grupo yodo, un grupo fosfato, un grupo adenililo, un grupo succinilo, un grupo sulfato, un grupo selenio, un grupo de hidrato de carbono, un grupo almidón, un grupo hidroxil-etil-almidón (HES), un grupo de polisacárido, un grupo de azúcar, un grupo polietilenglicol (PEG), un grupo de ubiquitina, un grupo de pululano, un grupo de quitosano, un grupo ácido hialurónico, un grupo de sulfato de condroitina, un grupo de sulfato de dermatano, un grupo de dextrano, un grupo de carboximetil-dextrano, un grupo de poli(óxido de alquileo) (PAO), un grupo de polialquilenglicol (PAG), un grupo de polipropilenglicol (PPG), un grupo de polioxazolona, un grupo de poliacriloilmorfolina, un grupo de poli(alcohol vinílico) (PVA), un grupo de policarboxilato, un grupo de polivinilpirrolidona (PVP), un grupo de polifosfazeno, un grupo de polioxazolona, un grupo de polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, un grupo de poli(hidroximetilformal de 1-hidroximetil-etileno) (PHF) y un grupo fosfato de 2-metacrililoxi-2'-etiltrimetilamonio (MPC).

Los procesos que se sabe que unen un grupo funcional bioquímico a un aminoácido del polipéptido incluyen, sin limitación, miristoilación, palmitoilación, isoprenilación (prenilación), glicolación, lipoilación, flavinilación, fosfopanteteinilación, retinilidenilación, diftamidilación, etanolamina-fosfoglicerilación, hipusinilación, acilación, acetilación, formilación, alquilación, amidación, arginilación, poliglutamilación, poliglicilación, butirilación, gamma-carboxilación, glicosilación, polisialilación, malonilación, hidroxilación, yodación, nucleosilación, oxidación, fosfoesterificación, fosforamidación, fosforilación, adelinilación, propionilación, piroglutamato, S-glutationilación, S-nitrosilación, succinilación, sulfatación, selenoilación, glicación, biotinilación, acilación, pegilación, hesilación, silación (almidonación), citrulinación, desamidación, eliminilación, carbamilación, desiminación, pupilación, nedilación, ubiquitinación, ubiquitinación, sumoilación e isglilación.

Algunos aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una muestra que comprende un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. Una muestra puede ser cualquier material que va a someterse a ensayo para detectar la presencia o actividad de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. Puede someterse a ensayo una variedad de muestras según un método divulgado en el presente documento incluyendo, sin limitación, un polipéptido recombinante purificado, parcialmente purificado o no purificado divulgado en el presente documento; un producto de polipéptido recombinante formulado; lisados celulares en bruto, fraccionados o parcialmente purificados, o purificados a partir de, por ejemplo, fuentes de bacterias, levaduras, insectos o mamíferos; y muestras de células, tejidos u órganos. Una muestra puede ser de cualquier sujeto individual, incluyendo pero sin limitarse a, insectos o mamíferos tales como, por ejemplo, humanos, aves, animales porcinos, equinos, bovinos, murinos, gatos, ratas, perros u ovejas.

En un aspecto de esta realización, una muestra puede ser una muestra biológica que contiene o potencialmente contiene un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. Una muestra biológica puede incluir cualquier muestra de células, tejidos u órganos tomada directamente de un individuo. Una muestra biológica también puede ser una muestra de cualquier líquido corporal tomado directamente de un individuo, incluyendo, sin limitación, sangre, orina, esputo, semen, heces, saliva, bilis, líquido cerebral, frotis nasal, frotis genitourinario, aspirado nasal, líquido cefalorraquídeo, etc. Una muestra biológica también puede incluir cualquier preparación derivada de una muestra tomada directamente de un individuo incluyendo, sin limitación, una fracción de plasma de una muestra de sangre, una fracción de suero de una muestra de sangre o un eluido de un proceso de purificación. Una muestra de sangre se refiere a cualquier muestra tomada o derivada de sangre, tal como una muestra de sangre total, una muestra de plasma sanguíneo o una muestra de suero sanguíneo.

Una muestra puede tratarse de modo que mejore la detectabilidad de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento o su actividad dentro de la muestra. Tales tratamientos pueden, por ejemplo, reducir la viscosidad de la muestra o purificar una fracción componente de la muestra. Los métodos de tratamiento pueden implicar lisis, dilución, purificación, extracción, filtración, destilación, separación, concentración, inactivación de componentes interferentes y la adición de reactivos. Además, un material sólido del que se sospecha que contiene un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento puede usarse como muestra de prueba una vez que se modifica para formar un medio líquido o para liberar el polipéptido recombinante. La selección y el tratamiento previo de las muestras biológicas antes de las pruebas se conocen bien en la técnica y no es necesario describirlos con más detalle.

En tratamientos que implican extracción, un tampón de extracción puede comprender, en realizaciones particulares, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,125 M de sal en una disolución tamponada, aunque esto es un intervalo no limitativo y también pueden usarse otras molaridades por debajo de 0,75 M y/o por encima de 1,25 M. En una realización, una sal en disolución tamponada es de aproximadamente 0,75 M, 1 M, 1,1 M o 1,125 M. En realizaciones adicionales, se proporciona un agente zwitteriónico (por ejemplo, Zwittergent 3/12) para mejorar la extracción de uno o más compuestos modificados. Por ejemplo, se proporciona un agente zwitteriónico en un tampón de extracción a aproximadamente del 0,1 % a aproximadamente el 1,5 %. En aún realizaciones adicionales, un agente Zwittergent está a una concentración de aproximadamente el 0,1 %, el 0,15 %, el 0,175 %, el 0,2 %, el 0,225 %, el 0,25 %, el 0,275 %, el 0,3 %, el 0,325 %, el 0,350 %, el 0,375 %, el 0,4 %, el 0,425 %, el 0,450 %, el 0,475 %, el 0,5 %, el 0,525 %, el 0,550 %, el 0,575 %, el 0,6 %, el 0,7 %, el 0,75 %, el 1,0 %, el 1,1 %, el 1,2 %, el 1,3 %, el 1,4 %, el 1,5 %, el 1,6 %, el 1,7 %, el 1,8 %, el 1,9 % o el 2,0 %. Los ejemplos del agente zwitteriónico incluyen Zwittergent 3/12; la mayoría de los aminoácidos a pH fisiológico usados como agentes tamponantes en los tampones de Good: basados en ácido amino-sulfónico MES, MOPS, HEPES, PIPES o CHAPS (1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]); la glicina basada en ácido amino-carboxílico (aminoácido), sus derivados bicina y tricina, y alanina; CHAPSO (2-hidroxi-1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]); CAPSO (ácido (3-ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico); productos naturales tales como los alcaloides psilocibina y ácido lisérgico; betainas; zwitteriones quinonoides; fármacos tales como la fexofenadina (Allegra) y la cefaloridina; ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico, ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico, ácido 2-[(2-amino-2-oxoetil)amino]-etanosulfónico, piperazin-*N,N'*-bis(2-ácido etanosulfónico), ácido 3-(*N*-morfolino)-2-hidroxiopropanosulfónico, ácido *N,N*-bis(2-hidroxi-etil)-2-aminoetanosulfónico, ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico, *N*-(2-hidroxi-etil)piperazin-*N'*-(ácido 2-etanosulfónico), ácido *N*-Tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico, ácido 3-[(*N,N*-bis(2-hidroxi-etil)amino)-2-hidroxiopropanosulfónico, ácido 3-[(*N*-tris(hidroximetil)-metilamino)-2-hidroxiopropanosulfónico, ácido *N*-(2-hidroxi-etil)piperazin-*N'*-(2-hidroxiopropanosulfónico), piperazin-*N,N'*-bis(ácido 2-hidroxiopropanosulfónico), *N*-(2-hidroxi-etil)piperazin-*N'*-(ácido 3-propanosulfónico), ácido *N*-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico, ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxi-etil)amino]-2-hidroxiopropanosulfónico, ácido 2-(*N*-ciclohexilamino)etanosulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico, 2-amino-2-metil-1-propanol, ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico, o mezclas de los mismos. Los agentes y/o detergentes zwitteriónicos elegidos no deben incluir la entidad particular (es decir, PEG, HES, etc.) que se usa para modificar el compuesto medido en un ensayo particular.

Algunos aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan un agente de captura. Un agente de captura o un agente de captura que reconoce una modificación se refiere a cualquier molécula capaz de unirse selectivamente o de manera sustancialmente selectiva (es decir, con reactividad cruzada limitada) a un resto presente en una modificación divulgada en el presente documento o asociada de otro modo con una modificación divulgada en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el término "selectivamente" se refiere a tener una influencia o un efecto único o a reaccionar de un solo modo o con una sola cosa. Tal como se usa en el presente documento, el término "se une selectivamente", cuando se hace en referencia a un agente de captura, se refiere a la unión discriminatoria del agente de captura al epítipo diana indicado, de tal manera que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de manera cruzada con los epítipos no diana. Cualquier agente de captura que pueda unirse selectivamente a una modificación presente en un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento puede usarse en los métodos divulgados en el presente documento. Un agente de captura tiene generalmente una especificidad única, aunque pueden usarse agentes de captura que tienen múltiples especificidades para dos o más polipéptidos recombinantes divulgados en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de un agente de captura incluyen un anticuerpo, un aptámero, un péptido sintético, una molécula de unión y un ácido nucleico.

La unión selectiva de un agente de captura incluye propiedades de unión tales como, por ejemplo, afinidad de unión, especificidad de unión y avidez de unión. La afinidad de unión se refiere a la cantidad de tiempo que un agente de captura reside en su sitio o resto de unión, y puede considerarse que es la fuerza con la que un agente de captura se une a su sitio o resto de unión. La afinidad de unión puede describirse como la constante de disociación de equilibrio (Kd) de un agente de captura, que se define como la relación K_d/K_a en el equilibrio, donde K_a es la constante de velocidad de asociación de un agente de captura y k_d es la constante de velocidad de disociación de un agente de captura. La afinidad de unión está determinada tanto por la asociación como por la disociación y, por sí sola, ninguna alta asociación o baja disociación puede garantizar una alta afinidad. La constante de velocidad de asociación (K_a), o la constante de velocidad de activación (K_{on}), mide el número de eventos de unión por unidad de tiempo, o la propensión de un agente de captura y su sitio o resto de unión a asociarse reversiblemente en su complejo agente-resto. La constante de velocidad de asociación se expresa en $M^{-1} s^{-1}$, y se simboliza de la siguiente manera: $[CA] \times [BS] \times K_{on}$. Cuanto mayor sea la constante de velocidad de asociación, más rápidamente se unirá el agente de captura a su sitio o resto de unión, o mayor será la afinidad de unión entre un agente de captura y su sitio o resto de unión. La constante de velocidad de disociación (K_d), o la constante de velocidad de desactivación (K_{off}), mide el número de eventos de disociación por unidad de tiempo, la propensión del complejo agente-resto a separarse (disociarse) reversiblemente en sus moléculas componentes, a saber, el agente de captura y su sitio o resto de unión. La constante de velocidad de disociación se expresa en s^{-1} , y se simboliza de la siguiente manera: $[CA + BS] \times K_{off}$. Cuanto menor sea la constante de velocidad de disociación, más estrechamente unido estará un agente de captura a su sitio o resto de unión, o mayor será la afinidad de unión entre el agente de captura y su sitio o resto de unión. La constante de disociación de equilibrio (KD) mide la velocidad a la que se formaron los nuevos complejos agente-resto que es igual a la velocidad a la que los complejos agente-resto se disocian en el equilibrio. La constante de disociación de equilibrio se expresa en M, y se define como $K_{off}/K_{on} = [CA] \times [BS]/[CA + BS]$, donde $[CA]$ es la concentración molar de un agente de captura, $[BS]$ es la concentración molar del sitio o resto de unión, y $[CA + BS]$ es la concentración molar del complejo agente-resto, donde todas las concentraciones son de dichos componentes cuando el sistema está en equilibrio. Cuanto menor sea la constante de disociación de equilibrio, más estrechamente unido estará un agente de captura a su sitio o resto de unión, o mayor será la afinidad de unión entre un agente de captura y su sitio o resto de unión.

En una realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de velocidad de asociación de, por ejemplo, menos de $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, menos de $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, menos de $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ o menos de $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. En otra realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de velocidad de asociación de, por ejemplo, más de $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, más de $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, más de $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ o más de $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. En otros aspectos, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de velocidad de asociación entre $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ y $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, de $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ a $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, de $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ a $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, o de $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ a $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$.

En otra realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de velocidad de disociación de menos de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$, menos de $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ o menos de $1 \times 10^{-5} s^{-1}$. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ejemplo, menos de $1,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $2,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $3,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $4,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $5,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $6,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $7,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $8,0 \times 10^{-4} s^{-1}$ o menos de $9,0 \times 10^{-4} s^{-1}$. En otra realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ejemplo, más de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$, más de $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ o más de $1 \times 10^{-5} s^{-1}$. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ejemplo, más de $1,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $2,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $3,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $4,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $5,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $6,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $7,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $8,0 \times 10^{-4} s^{-1}$ o más de $9,0 \times 10^{-4} s^{-1}$.

En otra realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de disociación de equilibrio de menos de 0,500 nM. En aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de disociación de equilibrio de, por ejemplo, menos de 0,500 nM, menos de 0,450 nM, menos de 0,400 nM, menos de 0,350 nM, menos de 0,300 nM, menos de 0,250 nM, menos de 0,200 nM, menos de 0,150 nM, menos de 0,100 nM o menos de 0,050 nM. En otra realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de disociación de equilibrio de más de 0,500 nM. En aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de disociación de equilibrio de, por ejemplo, más de 0,500 nM, más de 0,450 nM, más de 0,400 nM, más de 0,350 nM, más de 0,300 nM, más de 0,250 nM, más de 0,200 nM, más de 0,150 nM, más de 0,100 nM o más de 0,050 nM.

En aún otra realización, la afinidad de unión de un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de velocidad de asociación para un polipéptido sin una modificación o un polipéptido con un patrón o grado de modificación diferente de, por ejemplo, menos de $1 \times 10^0 M^{-1} s^{-1}$, menos de $1 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$, menos de $1 \times 10^2 M^{-1} s^{-1}$, menos de $1 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$ o menos de $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$. En otra realización, la afinidad de unión de

un agente de captura divulgado en el presente documento puede tener una constante de velocidad de asociación para un polipéptido sin una modificación o un polipéptido con un patrón o grado de modificación diferente de, por ejemplo, como máximo $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o como máximo $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La especificidad de unión es la capacidad de un agente de captura para discriminar entre una molécula que contiene su sitio o resto de unión y una molécula que no contiene ese sitio o resto de unión. Un modo de medir la especificidad de unión es comparar la velocidad de asociación K_{on} de un agente de captura para una molécula que contiene su sitio o resto de unión en relación con la velocidad de asociación K_{on} de un agente de captura para una molécula que no contiene ese sitio o resto de unión. Por ejemplo, comparando la constante de velocidad de asociación (K_a) de un agente de captura para un polipéptido recombinante que comprende una modificación con respecto a un polipéptido recombinante sin tal modificación. En aspectos de esta realización, un agente de captura que se une selectivamente a un polipéptido recombinante que comprende una modificación tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para un polipéptido recombinante sin tal modificación de, por ejemplo, menos de $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ menos de $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o menos de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ que la constante de velocidad de asociación (K_a) para un polipéptido recombinante sin tal modificación o un polipéptido recombinante con un patrón o grado de modificación diferente. En otros aspectos de esta realización, un agente de captura que se une selectivamente a un polipéptido recombinante que comprende una modificación tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para un polipéptido recombinante sin tal modificación de, por ejemplo, como máximo $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o como máximo $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En aún otros aspectos de esta realización, un agente de captura que se une selectivamente a un polipéptido recombinante que comprende una modificación tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para el polipéptido recombinante que comprende una modificación que es de más de $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o más de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en relación con la constante de velocidad de asociación (K_a) del agente de captura para un polipéptido recombinante sin tal modificación y/o la constante de velocidad de asociación (K_a) del agente de captura para un polipéptido recombinante con un patrón o grado de modificación diferente.

En aspectos aún de esta realización, un agente de captura que se une selectivamente a un polipéptido recombinante que comprende una modificación tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para un polipéptido recombinante sin tal modificación de, por ejemplo, al menos 2 veces más, al menos 3 veces más, al menos 4 veces más, al menos 5 veces más, al menos 6 veces más, al menos 7 veces más, al menos 8 veces más o al menos 9 veces más. En aspectos adicionales de esta realización, un agente de captura que se une selectivamente a un polipéptido recombinante que comprende una modificación tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para un polipéptido recombinante sin tal modificación de, por ejemplo, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, al menos 1000 veces más o al menos 10 000 veces más. En aún otros aspectos de esta realización, un agente de captura que se une selectivamente a un polipéptido recombinante que comprende una modificación tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para un polipéptido recombinante sin tal modificación de, por ejemplo, como máximo 1 vez más, como máximo 2 veces más, como máximo 3 veces más, como máximo 4 veces más, como máximo 5 veces más, como máximo 6 veces más, como máximo 7 veces más, como máximo 8 veces más o como máximo 9 veces más. En aún otros aspectos de esta realización, un agente de captura que se une selectivamente a un polipéptido recombinante que comprende una modificación tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para un polipéptido recombinante sin tal modificación de, por ejemplo, como máximo 10 veces más, como máximo 100 veces más, como máximo 1000 veces más o como máximo 10 000 veces más.

La especificidad de unión de un agente de captura también puede caracterizarse como una razón de especificidad de unión de un polipéptido recombinante que comprende una modificación con respecto a un polipéptido recombinante sin tal modificación. En aspectos de esta realización, un agente de captura tiene una razón de especificidad de unión para un polipéptido recombinante que comprende una modificación con respecto a un polipéptido recombinante sin tal modificación de, por ejemplo, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1 o al menos 40:1. En aún otros aspectos de esta realización, un agente de captura tiene una razón de especificidad de unión para un polipéptido recombinante que comprende una modificación con respecto a un polipéptido recombinante sin tal modificación de, por ejemplo, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1 o al menos 40:1. En todavía otros aspectos de esta realización, un agente de captura tiene una razón de especificidad de unión para un polipéptido recombinante que comprende una modificación con respecto a un polipéptido recombinante sin tal modificación de, por ejemplo, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1 o al menos 40:1.

La avidéz de unión, también conocida como afinidad funcional, se refiere a la suma total de la fuerza de unión funcional entre un agente de captura multivalente y su sitio o resto de unión. Un agente de captura puede tener más de un sitio de unión y muchas modificaciones contienen más de un sitio o resto de unión. Mientras que la avidéz de unión de un agente de captura depende de las afinidades de unión de los sitios de unión de agentes de captura

individuales, la avidéz de unión es mayor que la afinidad de unión ya que todas las interacciones agente-resto deben romperse simultáneamente para que un agente de captura se disocie por completo. Se prevé que un agente de captura pueda unirse selectivamente a todos y cada uno de los sitios o restos de unión para ese agente de captura.

5 Normalmente, el agente de captura puede distinguir un polipéptido recombinante que comprende una modificación divulgada en el presente documento del mismo polipéptido pero sin la modificación o con un patrón o grado diferente de la misma modificación. Un polipéptido no modificado, así como un polipéptido pero sin una modificación, se refiere a un polipéptido que no contiene la modificación presente en un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. Un polipéptido no modificado puede estar presente en una muestra pero no se unirá selectivamente a un agente de captura divulgado en el presente documento ya que el polipéptido carece de la modificación que se requiere para la captura. Un ejemplo no limitativo de un polipéptido no modificado es un polipéptido que se produce de manera natural o endógeno expresado a partir del genoma del individuo del que se tomó o derivó directamente una muestra. Otro ejemplo no limitativo de un polipéptido no modificado es un polipéptido recombinante expresado a partir de un sistema de expresión procariota.

15 Un polipéptido que comprende un patrón o grado de modificación diferente se refiere a un polipéptido que tiene la modificación presente en un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento, pero en un patrón o grado que permite que los métodos divulgados en el presente documento distingan los dos tipos de polipéptidos. Por ejemplo, un polipéptido que tiene un patrón o grado de modificación diferente puede estar presente en una muestra, pero no se unirá selectivamente a un agente de captura divulgado en el presente documento, ya que el polipéptido carece del patrón o grado de modificación que se requiere para la captura. Un ejemplo no limitativo de un polipéptido que tiene un patrón o grado de modificación diferente es un polipéptido que se produce de manera natural o endógeno expresado a partir del genoma del individuo del que se tomó o derivó directamente una muestra. Otro ejemplo no limitativo de un polipéptido que tiene un patrón o grado de modificación diferente es un polipéptido recombinante expresado a partir de un sistema de expresión procariota. Aún otro ejemplo no limitativo de un polipéptido que tiene un patrón o grado de modificación diferente es un polipéptido recombinante expresado a partir de células de una línea de cultivo celular diferente de las células de una línea de cultivo celular usada para expresar un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. Todavía otro ejemplo no limitativo de un polipéptido que tiene un patrón o grado de modificación diferente es un polipéptido recombinante expresado usando un proceso de fabricación diferente del proceso de fabricación usado para expresar un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento.

35 En una realización, un agente de captura es un anticuerpo. Un anticuerpo se refiere a una molécula generada por un sistema inmunitario que se produjo en respuesta a un antígeno particular que se une específicamente a ese antígeno e incluye tanto anticuerpos que se producen de manera natural como anticuerpos que no se producen de manera natural. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un dímero, un multímero, un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico, tal como por ejemplo, fragmentos Fv estabilizados con disulfuro, tándems scFv [fragmentos (scFv)₂], un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo multivalente, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo bifuncional, un anticuerpo asociado a células como un receptor de Ig, un anticuerpo lineal, un diacuerpo, un tricuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, o un derivado o análogo de los mismos, siempre que el fragmento muestre la actividad biológica deseada, y los derivados de cadena sencilla de los mismos. Un anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina de longitud completa que comprende los dominios V_H y V_L, así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}, o un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, tal como, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fc, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un Fv de cadena sencilla (scFv). Un anticuerpo puede derivar de cualquier especie de vertebrado (por ejemplo, humano, cabra, caballo, asno, murino, rata, conejo o pollo), y puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) o subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

50 Los anticuerpos útiles para poner en práctica los métodos divulgados en el presente documento están disponibles comercialmente o pueden generarse según métodos que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos monoclonales mediante el método del hibridoma. Pueden generarse fragmentos de anticuerpos a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos o pueden producirse directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, pueden recuperarse fragmentos Fab' directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂. En otra realización, puede formarse F(ab')₂ usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula de F(ab')₂. Según otro enfoque, pueden aislarse fragmentos Fv, Fab o F(ab')₂ directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos resultan evidentes para un experto habitual en la técnica.

60 Los ejemplos de un anticuerpo adecuado para los métodos divulgados en el presente documento incluyen, sin limitación, un anticuerpo anti-acetato, un anticuerpo anti-fosfato, un anticuerpo anti-lípido o un anticuerpo anti-hidrato de carbono, un anticuerpo anti-miristato, un anti-palmitato, un anticuerpo anti-isoprenoide como un anticuerpo anti-farnesol y un anticuerpo contra geranilgeraniol, un anticuerpo anti-glicosilfosfatidilinositol (GPI), un anticuerpo anti-lipoato, un anticuerpo anti-flavina, un anticuerpo anti-hemo C, un anti-4'-fosfopanteteinilo, un anticuerpo anti-retinilideno, un anticuerpo anti-diftamida, un anticuerpo anti-etanolamina-fosfoglicerol, un anticuerpo anti-hipusina, un

anticuerpo anti-acetilo, un anticuerpo anti-formilo, un anticuerpo anti-alquilo, un anticuerpo anti-metilo, un anticuerpo anti-amida, un anticuerpo anti-aminoácido, un anticuerpo anti-butilo, un anticuerpo anti-carboxilo, un anticuerpo anti-glicosilo, un anticuerpo anti-ácido polisialílico, un anticuerpo anti-hidroxiilo, un anticuerpo anti-malonilo, un anticuerpo anti-yodo, un anticuerpo anti-fosfato, un anticuerpo anti-adenilo, un anticuerpo anti-succinilo, un anticuerpo anti-sulfato, un anticuerpo anti-selenio, un anticuerpo anti-hidrato de carbono, un anticuerpo anti-polisacárido, un anticuerpo anti-almidón (anti-S), un anticuerpo anti-hidroxiil-etil-almidón (HES), un anticuerpo anti-azúcar, un anticuerpo anti-poli(etilenglicol) (PEG), un anticuerpo anti-ubiquitina, un anticuerpo anti-pululano, un anticuerpo anti-quitosano, un anticuerpo anti-ácido hialurónico, un anticuerpo anti-sulfato de condroitina, un anticuerpo anti-sulfato de dermatano, un anticuerpo anti-dextrano, un anticuerpo anti-carboximetil-dextrano, un anticuerpo anti-poli(óxido de alquileo) (PAO), un anticuerpo anti-poli(alquilenglicol) (PAG), un anticuerpo anti-polipropilenglicol (PPG), un anticuerpo anti-poli(oxazolona), un anticuerpo anti-poli(acrililmorfolina), un anticuerpo anti-poli(alcohol vinílico) (PVA), un anticuerpo anti-policarboxilato, un anticuerpo anti-poli(vinilpirrolidona) (PVP), un anticuerpo anti-poli(fosfazeno), un anticuerpo anti-poli(oxazolona), un anticuerpo anti-poli(etileno-co-anhídrido de ácido maleico), un anticuerpo anti-poli(estireno-co-anhídrido de ácido maleico), un anticuerpo anti-poli(hidroximetilformal de 1-hidroximetil(etileno)) (PHF) y un anticuerpo anti-fosfato de 2-metacrililoxi-2'-etiltrimetilamonio (MPC).

Un agente de captura divulgado en el presente documento puede unirse a una fase sólida como soporte para el agente de captura. Tal como se usa en el presente documento, el término "soporte en fase sólida" es sinónimo de "fase sólida" y se refiere a cualquier matriz que pueda usarse para inmovilizar el agente de captura divulgado en el presente documento. Puede construirse una fase sólida usando cualquier material adecuado con suficiente afinidad superficial para unirse a un agente de captura. El soporte de fase sólida seleccionado puede tener una propiedad física que lo hace fácilmente separable del material soluble o no unido y permite generalmente que materiales no unidos, como por ejemplo, reactivos en exceso, subproductos de la reacción o disolventes, se separen o retiren de otro modo (por ejemplo, mediante lavado, filtración, centrifugación, etc.) del componente de ensayo unido al soporte en fase sólida. Los ejemplos no limitativos de cómo producir y usar un soporte de fase sólida se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, citado anteriormente, (2001); y *Current Protocols in Molecular Biology*, citado anteriormente, (2004), cada uno de los cuales se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

Los soportes sólidos útiles incluyen: hidratos de carbono poliméricos naturales y sus derivados modificados, reticulados o sustituidos sintéticamente, tales como agar, agarosa, ácido alginico reticulado, gomas guar sustituidas y reticuladas, dextrano, diazocelulosa, hidratos de carbono, almidón, ésteres de celulosa, especialmente con ácido nítrico y ácidos carboxílicos, ésteres mixtos de celulosa y éteres de celulosa; polímeros naturales que contienen nitrógeno, tales como proteínas y derivados, incluyendo gelatinas modificadas o reticuladas; polímeros de hidrocarburos naturales, tales como látex y caucho; polímeros sintéticos, tales como polímeros de vinilo, incluyendo polietileno, polipropileno, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), poli(acetato de vinilo) y sus derivados parcialmente hidrolizados, poliacrilamidas, polimetacrilatos, copolímeros y terpolímeros de los policondensados anteriores, tales como poliésteres, poliamidas y otros polímeros, tales como poliuretanos o poliepóxidos; materiales inorgánicos tales como sulfatos o carbonatos de metales alcalinotérreos y magnesio, incluyendo sulfato de bario, sulfato de calcio, carbonato de calcio, silicatos de metales alcalinos y alcalinotérreos, aluminio y magnesio; y óxidos o hidratos de aluminio o silicio, tales como arcillas, alúmina, talco, caolín, zeolita, gel de sílice o vidrio (estos materiales pueden usarse como filtros con los materiales poliméricos anteriores); y mezclas o copolímeros de las clases anteriores, tales como copolímeros de injerto obtenidos iniciando la polimerización de polímeros sintéticos en un polímero natural preexistente. También pueden usarse nitrocelulosa y nailon. Todos estos materiales pueden usarse en formas adecuadas, como películas, láminas, tubos, columnas; alfileres o "varillas"; una partícula magnética, materiales particulados, micropartículas, perlas o placas, o pueden recubrirse, unirse o laminarse en portadores inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas de plástico, telas, o similares.

Alternativamente, una fase sólida puede constituir micropartículas. Las micropartículas apropiadas incluyen aquellas compuestas por poliestireno, polimetilacrilato, polipropileno, látex, politetrafluoroetileno, poli(acrilonitrilo), policarbonato, o materiales similares. Además, las micropartículas pueden ser micropartículas magnéticas o paramagnéticas, para facilitar la manipulación de la micropartícula dentro de un campo magnético. Las micropartículas pueden suspenderse en la mezcla de reactivos solubles y muestra biológica o pueden retenerse e inmovilizarse mediante un material de soporte. En este último caso, las micropartículas sobre o en el material de soporte no son capaces de realizar movimientos sustanciales a otras posiciones dentro del material de soporte. Alternativamente, las micropartículas pueden separarse de la suspensión en la mezcla de reactivos solubles y muestra biológica mediante sedimentación o centrifugación. Cuando las micropartículas son magnéticas o paramagnéticas, las micropartículas pueden separarse de la suspensión en la mezcla de reactivos solubles y muestra biológica mediante un campo magnético.

Un agente de captura puede unirse a la fase sólida mediante adsorción, donde se retiene por fuerzas hidrófobas. Alternativamente, la superficie de una fase sólida puede activarse mediante procesos químicos que provocan el enlace covalente del agente de captura al soporte. Un agente de captura puede unirse a la fase sólida mediante captura iónica, donde se retiene por un polímero cargado.

Después de la etapa de incubación divulgada en el presente documento, se realiza una etapa de purificación para

enriquecer un complejo de agente de captura tal como, por ejemplo, un complejo polipéptido recombinante-agente, un complejo factor de coagulación-agente, un complejo factor VII-anticuerpo, un complejo factor VIII-anticuerpo y un complejo factor IX-anticuerpo. En general, la purificación del complejo puede incluir la captura del complejo a una forma más concentrada, etapas intermedias de purificación para retirar las impurezas y/o pulido para retirar impurezas y variantes de proteínas adicionales. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Protein Science, "Conventional chromatographic Separations", caps. 8-9, (John Wiley & Sons Inc., Hoboken, N.J., 1995). Los métodos de purificación habituales incluyen, sin limitación, cromatografía de afinidad, filtración en gel, precipitación y/o cromatografía de exclusión molecular. Los procesos útiles como etapas intermedias o de pulido incluyen cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxapatita cerámica, HPLC de fase inversa, filtración en gel, precipitación, diafiltración, cromatografía de afinidad o cromatografía de enfoque.

La detección de la presencia o una actividad de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento puede lograrse mediante cualquier ensayo que pueda medir cualitativa o cuantitativamente una característica indicativa de la presencia o una actividad asociada con el polipéptido que está monitorizándose, incluyendo, sin limitación, un ensayo *in vitro*, un ensayo basado en células, o un ensayo *in vivo*. Además, un ensayo puede ser un ensayo de polipéptido no específico, tal como, por ejemplo, ensayo de absorción UV o un ensayo químico como un ensayo de Bradford o un ensayo de Biuret, o un ensayo de polipéptido específico, tal como por ejemplo, un ensayo cromogénico, un ensayo colorimétrico, un ensayo cronométrico, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de electroquimioluminiscencia, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo fluorogénico, un ensayo de transferencia de energía por resonancia, un ensayo de polarización plana, un ensayo de citometría de flujo, un ensayo de base inmunológica o un ensayo de actividad como una actividad enzimática, una actividad inhibitoria, una actividad de coagulación o una actividad de polimerización. El ensayo real usado para detectar una característica de un polipéptido tal como se divulga en el presente documento puede determinarlo un experto habitual en la técnica teniendo en cuenta factores que incluyen, sin limitación, el polipéptido que está sometiéndose a ensayo, la cantidad de polipéptido presente, la característica que está sometiéndose a ensayo, y la preferencia del experto habitual en la técnica. La detección de la presencia o la actividad de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento puede ponerse en práctica de modo singleplex o múltiplex.

La detección de la presencia o actividad de un polipéptido es indicativa de la presencia del polipéptido recombinante que comprende la modificación.

Los ejemplos no limitativos de ensayos de base inmunológica incluyen análisis de inmunotransferencia, como inmunotransferencia de tipo Western e inmunotransferencia puntual, análisis de inmunoprecipitación, análisis inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y ELISA tipo sándwich. La detección de la señal puede lograrse mediante autorradiografía con obtención de imágenes o detección y cuantificación de la radiactividad (*phosphorimaging*) (AU), quimioluminiscencia (CL), electroquimioluminiscencia (ECL), bioluminiscencia (BL), fluorescencia, transferencia de energía por resonancia, polarización plana, colorimetría o citometría de flujo (FC). Se divulgan descripciones de los sistemas de detección de base inmunológica, por ejemplo, en Michael M. Rauhut, Chemiluminescence, en Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3.^a ed., John Wiley and Sons, 1985); A. W. Knight, A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenerated Chemiluminescence, Trends Anal. Chem. 18 (1): 47-62 (1999); K. A. Fahnrich, *et al.*, Recent Applications of Electrogenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis, Talanta 54 (4): 531-559 (2001); Commonly Used Techniques in Molecular Cloning, págs. A 8.1-A8-55 (Sambrook y Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3.^a ed. 2001); Detection Systems, págs. A 9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3.^a ed. 2001); Electrogenerated Chemiluminescence, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004), cada uno de los cuales se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

Un ensayo cromogénico que usa sustratos peptídicos compuestos por un oligopéptido o resto de polipéptido específico y un cromóforo (portador de colorante) y se usa habitualmente para determinar factores que presentan actividad proteasa, por ejemplo para determinar factores de coagulación en muestras de sangre y plasma. El sustrato peptídico cromogénico, que inicialmente es incoloro, se escinde, dependiendo de la cantidad y/o actividad de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento que está presente en la muestra, liberando así el cromóforo. La escisión cambia las propiedades ópticas del producto, que son diferentes de las del sustrato no escindido y que pueden medirse mediante espectrofotometría. Los ejemplos no limitativos de grupos cromogénicos que pueden acoplarse a un sustrato peptídico son para-nitroanilina (pNA), ácido 5-amino-2-nitrobenzoico (ANBA), 7-amino-4-metoxicumarina (ANC), quinonilamida (QUA), 5-aminoisoftalato de dimetilo (DPA) y sus derivados. Los sustratos fluorogénicos incluyen, sin limitación, Z-Gly-Pro-Arg-AMC [Z = benciloxicarbonilo; AMC = 7-amino-4-metilcumarina], ácido homovanílico, ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazinas reducidas, benzotiazinas reducidas, Amplex®, β -D-galactopiranosido de resorufina, digalactósido de fluoresceína (FDG), diglucurónido de fluoresceína y sus variantes estructurales (patentes estadounidenses n.^{os} 5.208.148; 5.242.805; 5.362.628; 5.576.424 y 5.773.236, β -D-galactopiranosido de 4-metilumbeliferilo, β -D-galactopiranosido de carboxiumbeliferilo y β -D-galactopiranosidos de cumarina fluorados (patente estadounidense n.º 5.830.912).

Un ensayo de actividad no limitativo es un ensayo cromogénico basado en la cascada de coagulación sanguínea que puede usarse para detectar la actividad de FVIII. En este ensayo, el factor VIII activado por trombina forma un

complejo con el factor IXa, y este complejo activa posteriormente el factor X. Se puede acceder a la actividad de factor X activado mediante la hidrólisis de un sustrato cromogénico que libera un grupo cromogénico como p-nitroanilina (pNA). La velocidad inicial de liberación de pNA, determinada por un cambio en la absorbancia por minuto medida a 405 nm en DO, es proporcional a la actividad de factor Xa y posteriormente a la actividad de FVIII en la muestra. Al usar un exceso de factor IXa y factor X, la velocidad de activación del factor X es únicamente proporcional a la cantidad de factor VIII escindido de trombina presente en la muestra. Alternativamente, la actividad de factor IXa puede determinarse alterando las condiciones para que el factor VIII y el factor X estén en exceso, y como tal, el factor IXa es limitante de la velocidad. De manera similar, la actividad de factor X puede determinarse alterando las condiciones para que el factor VIII y el factor IXa estén en exceso, y como tal, el factor X es limitante de la velocidad. Por tanto, la actividad de factor VIII, así como de factor IXa y factor X, puede detectarse usando un ensayo cromogénico basado en la cascada de coagulación sanguínea.

Otro ensayo de actividad no limitativo es un ensayo cromogénico basado en la cascada de coagulación sanguínea que puede usarse para detectar la actividad de trombina. Tales ensayos pueden usar el sustrato peptídico acoplado a pNA Ala-Gly-Arg-pNA (PEFACHROM®TG, Pentapharm Ltd., Basilea, Suiza) o el sustrato peptídico acoplado a AMC Gly-Cly-Arg-AMC (Bachem). Otros sustratos peptídicos adecuados que son escindidos por la trombina son los de fórmula general Msc-Val-Xaa-R₁, en la que Msc es metilsulfonil-etiloxicarbonilo, Val es el aminoácido valina y Xaa es un residuo de aminoácido, que comprende un grupo guanidino terminal o un grupo ureido que está separado de la estructura principal peptídica por al menos dos átomos de carbono, y en la que R₁ es un grupo cromogénico, con el péptido Msc-Val-Arg-R₁ o Msc-Val-Arg-pNA. Otros ejemplos de sustratos de péptidos cromogénicos que tienen especificidades para diferentes proteasas pueden encontrarse, por ejemplo, en el documento U.S. 4.508.644.

Un ensayo de actividad no limitativo es un ensayo de coagulación de una etapa que aplica el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) que puede usarse para detectar la actividad de FVIII. En este ensayo cronométrico, se añaden muestras que comprenden factor VIII, junto con CaCl₂, a plasma deficiente en factor VIII para promover la coagulación y el efecto de esta muestra sobre el tiempo de coagulación TTPA del plasma puede determinarse en un aparato MDA-II (BioMerieux, Marcy-l'Etoile) y es una medida de la actividad de factor VIII. Las actividades de muestras desconocidas se calculan comparando la actividad de factor VIII observada con una curva patrón generada a partir de muestras de actividad de factor VIII conocidas. La actividad coagulante puede medirse mediante un ensayo cronométrico en una plataforma robótica y la actividad cronométrica de los compuestos modificados puede compararse con la actividad de un FVIII de tipo natural usado como patrón interno. Este ensayo de coagulación sanguínea también puede usarse para cualquier otra proteína involucrada en la cascada de coagulación sanguínea usando un plasma deficiente en la proteína que está sometándose a ensayo.

Los métodos divulgados en el presente documento pueden evaluarse mediante varios parámetros que incluyen, por ejemplo, exactitud, precisión, límite de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), intervalo, especificidad, selectividad, linealidad, robustez e idoneidad del sistema. La exactitud de un método es la medida de cómo de exacto es un método analítico, o el grado de concordancia entre el valor medido y el valor que se acepta como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado. La precisión de un método es el grado de acuerdo entre los resultados de las pruebas individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. Como tal, la precisión evalúa 1) la variabilidad dentro del ensayo; 2) la variabilidad dentro de un día (repetibilidad); y 3) la variabilidad entre días (precisión intermedia); y 4) la variabilidad entre laboratorios (reproducibilidad). El coeficiente de variación (% de CV) es una medida cuantitativa de la precisión expresada en relación con el valor medio observado o teórico.

Un método divulgado en el presente documento debe ser capaz de detectar, con relación al fondo, la presencia o actividad de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. El límite de detección (LOD) de un método se refiere a la concentración de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento que da lugar a una señal que es significativamente diferente del control negativo o blanco y representa la menor concentración de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento que puede distinguirse del fondo.

Por tanto, en una realización, un método divulgado en el presente documento puede detectar el LOD de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento en una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o blanco. En un aspecto de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6 ng o menos, 5 ng o menos, 4 ng o menos, 3 ng o menos, 2 ng o menos, 1 ng o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En todavía otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 900 pg o menos, 800 pg o menos, 700 pg o menos, 600 pg o menos, 500 pg o menos, 400 pg o menos, 300 pg o menos, 200 pg o menos, 100 pg o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En aspectos adicionales de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 90 pg o menos, 80 pg o menos, 70 pg o menos, 60 pg o menos, 50 pg o menos, 40 pg o menos, 30 pg o menos, 20 pg o menos, 10 pg o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En aún otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD

de, por ejemplo, 0,9 pg o menos, 0,8 pg o menos, 0,7 pg o menos, 0,6 pg o menos, 0,5 pg o menos, 0,4 pg o menos, 0,3 pg o menos, 0,2 pg o menos, 0,1 pg o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento.

5 En otro aspecto de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 10 nM o menos, 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos o 1 nM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 900 pM o menos, 800 pM o menos, 700 pM o menos, 600 pM o menos, 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos, 200 pM o menos o 100 pM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 100 pM o menos, 90 pM o menos, 80 pM o menos, 70 pM o menos, 60 pM o menos, 50 pM o menos, 40 pM o menos, 30 pM o menos, 20 pM o menos o 10 pM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En aún otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 10 pM o menos de un BoNT/A, 9 pM o menos, 8 pM o menos, 7 pM o menos, 6 pM o menos, 5 pM o menos, 4 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos o 1 pM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En todavía otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 1000 fM o menos, 900 fM o menos, 800 fM o menos, 700 fM o menos, 600 fM o menos, 500 fM o menos, 400 fM o menos, 300 fM o menos, 200 fM o menos o 100 fM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En todavía otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 100 fM o menos, 90 fM o menos, 80 fM o menos, 70 fM o menos, 60 fM o menos, 50 fM o menos, 40 fM o menos, 30 fM o menos, 20 fM o menos o 10 fM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En todavía otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOD de, por ejemplo, 10 fM o menos, 9 fM o menos, 8 fM o menos, 7 fM o menos, 6 fM o menos, 5 fM o menos, 4 fM o menos, 3 fM o menos, 2 fM o menos o 1 fM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento.

Los límites de cuantificación (LOQ) son las concentraciones menor y mayor de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento en una muestra o espécimen que puede medirse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. El límite inferior de cuantificación se refiere a la menor dosis que un método de detección puede medir de manera sistemática con relación al fondo. El límite superior de cuantificación es la mayor dosis que un método de detección puede medir de manera sistemática antes de que se produzca la saturación de la señal. El intervalo lineal del método es el área entre los límites inferior y superior de cuantificación. El intervalo lineal se calcula restando el límite inferior de cuantificación del límite superior de cuantificación. Tal como se usa en el presente documento, el término "relación señal/ruido para la asíntota inferior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite inferior de detección dividida entre la señal de fondo. Tal como se usa en el presente documento, el término "relación señal/ruido para la asíntota superior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite superior de detección dividida entre la señal de fondo.

40 Por tanto, en una realización, un método divulgado en el presente documento puede detectar el LOQ de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento en una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o blanco. En el aspecto de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6 ng o menos, 5 ng o menos, 4 ng o menos, 3 ng o menos, 2 ng o menos, 1 ng o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En todavía otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 900 pg o menos, 800 pg o menos, 700 pg o menos, 600 pg o menos, 500 pg o menos, 400 pg o menos, 300 pg o menos, 200 pg o menos, 100 pg o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En aspectos adicionales de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 90 pg o menos, 80 pg o menos, 70 pg o menos, 60 pg o menos, 50 pg o menos, 40 pg o menos, 30 pg o menos, 20 pg o menos, 10 pg o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En aún otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 0,9 pg o menos, 0,8 pg o menos, 0,7 pg o menos, 0,6 pg o menos, 0,5 pg o menos, 0,4 pg o menos, 0,3 pg o menos, 0,2 pg o menos, 0,1 pg o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento.

60 En otro aspecto de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 10 nM o menos, 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos o 1 nM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 900 pM o menos, 800 pM o menos, 700 pM o menos, 600 pM o menos, 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos, 200 pM o menos o 100 pM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 100 pM o menos, 90 pM o menos, 80 pM o menos, 70 pM o menos, 60 pM o menos, 50 pM o menos,

40 pM o menos, 30 pM o menos, 20 pM o menos o 10 pM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En aún otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 10 pM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento, 9 pM o menos, 8 pM o menos, 7 pM o menos, 6 pM o menos, 5 pM o menos, 4 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos o 1 pM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En todavía otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 1000 fM o menos, 900 fM o menos, 800 fM o menos, 700 fM o menos, 600 fM o menos, 500 fM o menos, 400 fM o menos, 300 fM o menos, 200 fM o menos o 100 fM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En todavía otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 100 fM o menos, 90 fM o menos, 80 fM o menos, 70 fM o menos, 60 fM o menos, 50 fM o menos, 40 fM o menos, 30 fM o menos, 20 fM o menos o 10 fM o menos un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento. En todavía otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene un LOQ de, por ejemplo, 10 fM o menos, 9 fM o menos, 8 fM o menos, 7 fM o menos, 6 fM o menos, 5 fM o menos, 4 fM o menos, 3 fM o menos, 2 fM o menos o 1 fM o menos de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento.

Un método divulgado en el presente documento puede tener una precisión de no más del 50 %. En aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento puede tener una precisión de no más del 50 %, no más del 40 %, no más del 30 % o no más del 20 %. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento tiene una precisión de no más del 15 %, no más del 10 % o no más del 5 %. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento puede tener una precisión de no más del 4 %, no más del 3 %, no más del 2 % o no más del 1 %.

Un método divulgado en el presente documento puede tener una exactitud de al menos el 50 %. En aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento puede tener una exactitud de al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 % o al menos el 80 %. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento puede tener una exactitud de al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 %. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento puede tener una exactitud de al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %.

Un método divulgado en el presente documento puede tener una relación señal/ruido para la asíntota inferior que es estadísticamente significativa y una relación señal/ruido para la asíntota superior que es estadísticamente significativa. En aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento puede tener una relación señal/ruido para la asíntota inferior de, por ejemplo, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1 o al menos 20:1. En otros aspectos de esta realización, un método divulgado en el presente documento puede tener una relación señal/ruido para la asíntota superior de, por ejemplo, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1, al menos 40:1, al menos 45:1, al menos 50:1, al menos 60:1, al menos 70:1, al menos 80:1, al menos 90:1 o al menos 100:1, al menos 150:1, al menos 200:1, a al menos 250:1, al menos 300:1, al menos 350:1, al menos 400:1, al menos 450:1, al menos 500:1, al menos 550:1 o al menos 600:1.

La especificidad de un método divulgado en el presente documento define la capacidad del método para medir un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento con exclusión de otros componentes relevantes, tales como, por ejemplo, un polipéptido recombinante parcialmente activo o inactivo divulgado en el presente documento. La selectividad de un método divulgado en el presente documento describe la capacidad del método para diferenciar varias sustancias en una muestra. La linealidad de un método divulgado en el presente documento describe la capacidad del método para obtener resultados que son directamente, o mediante una transformación matemática bien definida, proporcionales a la concentración de un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento en la muestra. Por tanto, en una realización, un método divulgado en el presente documento puede distinguir un polipéptido recombinante divulgado en el presente documento de un polipéptido recombinante parcialmente activo divulgado en el presente documento que tiene, por ejemplo, el 70 % o menos, el 60 % o menos, el 50 % o menos, el 40 % o menos, el 30 % o menos, el 20 % o menos o el 10 % o menos de la actividad de un polipéptido recombinante completamente activo.

La solidez de un método divulgado en el presente documento describe la reproducibilidad de los resultados obtenidos para muestras idénticas en condiciones normales (pero variables) del método. La robustez de un método divulgado en el presente documento describe la capacidad del método para medir su capacidad de no verse afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad en el uso normal. Por tanto, mientras que la solidez evalúa los cambios inevitables, la robustez evalúa los cambios deliberados. Los parámetros típicos evaluados por la solidez y la robustez incluyen los efectos de la congelación/descongelación, los tiempos de incubación, la temperatura de incubación, la longevidad del reactivo, la preparación de muestras, el almacenamiento de muestras, el número de pases celulares, la cantidad de toxinas, la variabilidad entre las purificaciones y la variabilidad entre las reacciones de corte. Los parámetros de robustez para un método divulgado en el presente documento incluyen el banco de células (inicio, parte intermedia y final de la congelación), el nivel de pases celulares, la densidad de siembra celular, la densidad de la reserva celular (cuántos días en cultivo), la edad celular en el matraz (tiempo de espera para la siembra), tiempo de incubación, diferentes

placas, cantidades excesivas de suero y fuente de reactivos. La idoneidad del sistema de un método divulgado en el presente documento describe la capacidad del método para determinar el rendimiento del método, incluido el rendimiento de los reactivos e instrumentos, a lo largo del tiempo mediante el análisis de un patrón de referencia. La idoneidad del sistema se refiere al hecho de que el equipo, la electrónica, el rendimiento del ensayo y las muestras que van a analizarse constituyen un sistema integrado. La idoneidad del sistema puede evaluarse sometiendo a prueba el paralelismo, que es cuando se representa gráficamente la dosis logarítmica frente a la respuesta, las diluciones en serie de la referencia y las diluciones en serie de las muestras deben dar lugar a curvas paralelas.

En el contexto de la presente invención, el método para detectar la presencia de un polipéptido recombinante que comprende una modificación comprende las etapas de incubar una muestra que incluye el polipéptido recombinante que comprende la modificación con un agente de captura que se une selectivamente a la modificación en condiciones que permiten la unión selectiva del agente de captura a la modificación, formándose así un complejo polipéptido-agente, en el que la modificación asociada con el polipéptido recombinante se selecciona de al menos una de pegilación, hesilación, silación o polisialilación y en el que el agente de captura es un anticuerpo de reconocimiento de modificación; purificar el complejo polipéptido-agente de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del polipéptido recombinante y/o una actividad de polipéptido, en el que la detección del polipéptido recombinante y/o la actividad de polipéptido es indicativa de la presencia del polipéptido recombinante que comprende la modificación.

Algunos aspectos de la presente memoria descriptiva describen kits que comprenden uno o más componentes útiles para poner en práctica los métodos divulgados en el presente documento. El uno o más componentes de un kit pueden comprender uno o más agentes de captura divulgados en el presente documento, uno o más soportes en fase sólida y/o uno o más reactivos necesarios para detectar la presencia y/o una actividad de un polipéptido recombinante que comprende una modificación divulgada en el presente documento. Un kit divulgado en el presente documento puede incluir una fase sólida y un agente de captura fijado a la fase sólida. Un kit divulgado en el presente documento también puede comprender un polipéptido recombinante que comprende una modificación útil como control positivo para el agente de captura y/o la etapa de someter a ensayo. Si se desea, este componente puede incluirse en el kit de prueba en múltiples concentraciones para facilitar la generación de una curva patrón con la que puede compararse la señal detectada en la muestra de prueba.

Un kit incluye generalmente un envase con uno o más recipientes que contienen los componentes, como una o más composiciones independientes u, opcionalmente, como una mezcla cuando lo permita la compatibilidad de los reactivos. Un kit también puede incluir otro(s) material(es), lo que puede ser deseable desde el punto de vista del usuario, tal(es) como un(os) tampón/tampones, un(os) diluyente(s), un(os) patrón/patrones y/o cualquier otro material útil en el procesamiento de muestras, lavado o realización de cualquier otra etapa del ensayo. Un kit divulgado en el presente documento también puede incluir instrucciones para llevar a cabo uno o más métodos divulgados en el presente documento. Las instrucciones incluidas en los kits divulgados en el presente documento pueden adjuntarse al material de envasado o pueden incluirse como un prospecto. Si bien las instrucciones suelen ser materiales escritos o impresos, no se limitan a ellos. Las realizaciones divulgadas en el presente documento contemplan cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD-ROM), y similares. Tal como se usa en el presente documento, el término "instrucciones" puede incluir la dirección de un sitio de Internet que proporciona las instrucciones.

En el contexto de la presente invención, el uso de un kit para poner en práctica un método para detectar la presencia de un polipéptido recombinante que comprende una modificación es tal como se define en las reivindicaciones.

También pueden describirse algunos aspectos de la presente memoria descriptiva de la siguiente manera:

1. Un método para detectar la presencia de un polipéptido recombinante que comprende una modificación, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el polipéptido recombinante que comprende la modificación con un agente de captura que se une selectivamente a la modificación en condiciones que permiten la unión selectiva del agente de captura a la modificación, formándose así un complejo polipéptido-agente; purificar el complejo polipéptido-agente de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del polipéptido recombinante y/o una actividad de polipéptido, en el que la detección del polipéptido recombinante y/o la actividad de polipéptido es indicativa de la presencia del polipéptido recombinante que comprende la modificación.
2. El método según la realización 1, en el que la muestra incluye un polipéptido sin la modificación y/o un polipéptido con un patrón diferente de grado de modificación.
3. El método según la realización 2, en el que el polipéptido recombinante es un factor de crecimiento, una citocina, un agente inmunomodulador, una hormona, un anticuerpo, una enzima, un inhibidor enzimático, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una esterasa, una transferasa, una oxidoreductasa, una hidrolasa, una asparaginasa, una adenosina desaminasa, una neurotoxina, una proteína hepática, una proteína pancreática, una proteína muscular, una proteína cerebral, una proteína pulmonar o una proteína

sanguínea.

4. El método según la realización 3, en el que la esterasa es una butirilcolinesterasa o una acetilcolinesterasa.
5. El método según la realización 3, en el que la citocina es una quimiocina, una linfocina, un factor de necrosis tumoral, un factor hematopoyético.
6. El método según la realización 3, en el que el agente inmunomodulador es una interleucina o un interferón.
7. El método según la realización 3, en el que la proteína sanguínea es un agente estimulante de la eritropoyesis, una proteasa, un inhibidor de proteasa o un factor de coagulación.
8. El método según la realización 7, el agente estimulante de la eritropoyesis es una eritropoyetina, una eritropoetina, una eritropoyetina o una darbepoetina.
9. El método según la realización 7, la proteasa es tripsina, quimotripsina, elastasa, pepsina o ADAMTS13.
10. El método según la realización 7, el inhibidor de proteasa es α 1-antitripsina, α 1-antiquimotripsina, inhibidor de C1 o α 2-antiplasmina, antitrombina.
11. El método según la realización 7, en el que el factor de coagulación es un factor II, un factor IIa, un factor VII, un factor VIIa, un factor VIII, un factor VIIIa, un factor IX, un factor IXa, un factor X o un factor Xa.
12. El método según la realización 3, en el que la proteína sanguínea es ADAMTS-13, antiplasmina α 1, antiplasmina α 2, antitrombina, antitrombina III, procoagulante del cáncer, eritropoyetina, factor II, factor IIa, factor V, factor Va, factor VI, factor VIa, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, fibronectina, fibrinógeno (factor I), cofactor II de heparina, cininógeno de alto peso molecular (HMWK), inmunoglobulina intramuscular, inmunoglobulina intravenosa, plasmina, plasminógeno, inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI1), inhibidor 2 del activador del plasminógeno (PAI2), precalicreína, prostaciclina, proteína C, proteína C activa (APC), proteína S, proteína Z, inhibidor de proteasa relacionada con la proteína Z, trombomodulina, factor tisular (factor III), inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), activador del plasminógeno tisular (t-PA), urocinasa y factor de Von Willebrand.
13. Un método para detectar la presencia de un factor de coagulación recombinante que comprende una modificación, comprendiendo el método las etapas de:

incubar una muestra que incluye el factor de coagulación recombinante que comprende la modificación con un agente de captura que se une selectivamente a la modificación en condiciones que permiten la unión selectiva del agente de captura a la modificación, formándose así un complejo factor-agente;

purificar el complejo factor-agente de la muestra; y

someter a ensayo para detectar la presencia del factor de coagulación recombinante y/o una actividad de factor de coagulación, en el que la detección del factor de coagulación recombinante y/o la actividad de factor de coagulación es indicativa de la presencia del factor de coagulación recombinante que comprende la modificación.
14. El método según la realización 13, en el que la muestra incluye además un factor de coagulación sin la modificación y/o un factor de coagulación con un patrón o grado de modificación diferente.
15. El método según una cualquiera de las realizaciones 13-14, en el que el factor de coagulación es un factor II, un factor IIa, un factor VII, un factor VIIa, un factor VIII, un factor VIIIa, un factor IX, un factor IXa, un factor X o un factor Xa.
16. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-15, en el que la modificación es un grupo acetato, un grupo fosfato, un grupo de lípido o un grupo de hidrato de carbono, un grupo miristato, un grupo palmitato, un grupo isoprenoide como un grupo farnesol y grupo geranylgeraniol, un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI), un grupo lipoato, un grupo flavina, un grupo hemo C, un grupo 4'-fosfopanteteninilo, un grupo retinilideno, un grupo diftamida, un grupo etanolamina-fosfoglicerol, un grupo hipusina, un grupo acetilo, un grupo formilo, un grupo alquilo, un grupo metilo, un grupo amida, un aminoácido, un grupo butilo, un grupo carboxilo, un grupo glicosilo, un grupo ácido polisiálico (PSA), un grupo hidroxilo, un grupo malonilo, un grupo yodo, un grupo fosfato, un grupo adenililo, un grupo succinilo, un grupo sulfato, un grupo selenio, un grupo de hidrato de carbono, un grupo almidón, un grupo hidroxil-etil-almidón (HES), un grupo de polisacárido, un grupo de azúcar, un grupo de polietilenglicol (PEG), un grupo de ubiquitina, un grupo de pululano, un grupo de quitosano, un grupo de ácido hialurónico, un grupo de

- 5 sulfato de condroitina, un grupo de sulfato de dermatano, un grupo de dextrano, un grupo de carboximetil-dextrano, un grupo de poli(óxido de alquileo) (PAO), un grupo de polialquilenglicol (PAG), un grupo de polipropilenglicol (PPG) grupo, un grupo de polioxazolina, un grupo de poliacriloilmorfolina, un grupo de poli(alcohol vinílico) (PVA), un grupo de policarboxilato, un grupo de polivinilpirrolidona (PVP), un grupo de polifosfazeno, un grupo de polioxazolina, un grupo de polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, un grupo de poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, un grupo de poli (hidroximetilformal de 1-hidroximetileno) (PHF) o un grupo fosfato de 2-metacrililoixi-2'-etiltrimetilamonio (MPC).
- 10 17. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-16, en el que la modificación se asocia con el polipéptido recombinante mediante miristoilación, palmitoilación, isoprenilación (prenilación), glipiación, lipoilación, flavinilación, fosfopanteteinilación, retinilidenilación, diftamidilación, etanolamina-fosfoglicerilación, hipusinilación, acilación, acetilación, formilación, alquilación, amidación, arginilación, poliglutamilación, poliglicilación, butirilación, gamma-carboxilación, glicosilación, polisialilación, malonilación, hidroxilación, yodación, nucleosilación, oxidación, fosfoesterificación, fosforamidación, fosforilación, adenilación, propionilación, piroglutamato, S-glutationilación, S-nitrosilación, succinilación, sulfatación, selenoilación, glicación, biotinilación, acilación, pegilación, hesilación, silación, citrunilación, desamidación, eliminilación, carbamilación, desimidación, pupilación, nedilación, ubiquitinación, sumoilación o isgilación.
- 15 18. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-17, en el que la muestra incluye una preparación purificada del polipéptido recombinante, una preparación parcialmente purificada del polipéptido recombinante, una preparación no purificada del polipéptido recombinante, una preparación formulada del polipéptido recombinante; un extracto en bruto del polipéptido recombinante, un extracto fraccionado del polipéptido recombinante, un lisado celular que incluye el polipéptido recombinante, o una muestra biológica.
- 20 19. El método según la realización 18, en el que la muestra biológica comprende células, una muestra de tejido, una muestra de sangre, una muestra de líquido corporal o una muestra de órgano tomada directamente de un individuo.
- 25 20. El método según la realización 19, en el que el líquido corporal es orina, esputo, semen, heces, saliva, bilis, líquido cerebral, frotis nasal, frotis genitourinario, aspirado nasal o líquido cefalorraquídeo.
- 30 21. El método según la realización 18, en el que la muestra biológica es una preparación derivada de una muestra tomada directamente de un individuo.
- 35 22. El método según la realización 21, en el que la preparación derivada de la muestra tomada directamente del individuo es una fracción plasmática de una muestra de sangre, una fracción de suero de una muestra de sangre o un eluido de un proceso de purificación.
- 40 23. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-22, en el que la muestra se trata para mejorar la detectabilidad del polipéptido recombinante o mejorar la actividad de polipéptido recombinante.
- 45 24. El método según la realización 23, en el que el tratamiento comprende lisado, dilución, purificación, extracción, filtración, destilación, separación, concentración, inactivación de componentes interferentes, la adición de reactivos, o cualquier combinación de los mismos.
- 50 25. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-24, en el que el agente de captura tiene una constante de velocidad de asociación para un polipéptido que comprende la modificación de más de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o más de $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.
- 55 26. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-25, en el que el agente de captura tiene una constante de velocidad de disociación para un polipéptido que comprende la modificación de menos de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.
- 60 27. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-26, en el que el agente de captura tiene una constante de disociación de equilibrio para un polipéptido que comprende la modificación de menos de 0,500 nM, menos de 0,450 nM, menos de 0,400 nM, menos de 0,350 nM, menos de 0,300 nM, menos de 0,250 nM, menos de 0,200 nM, menos de 0,150 nM, menos de 0,100 nM o menos de 0,050 nM.
- 65 28. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-27, en el que el agente de captura tiene una constante de velocidad de asociación para un polipéptido sin una modificación o un polipéptido con un patrón o grado de modificación diferente de menos de $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o menos de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.
29. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-28, en el que el agente de captura tiene una

- 5 constante de velocidad de asociación (K_a) para el polipéptido recombinante que comprende una modificación que es de más de $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o más de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en relación con la constante de velocidad de asociación (K_a) del agente de captura para un polipéptido recombinante sin tal modificación y/o la constante de velocidad de asociación (K_a) del agente de captura para un polipéptido recombinante con un patrón o grado de modificación diferente.
- 10 30. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-28, en el que el agente de captura tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para el polipéptido recombinante que comprende una modificación que es de al menos 2 veces más, al menos 3 veces más, al menos 4 más veces, al menos 5 veces más, al menos 6 veces más, al menos 7 veces más, al menos 8 veces más, al menos 9 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, al menos 1000 veces más o al menos 10 000 veces más que la constante de velocidad de asociación (K_a) del agente de captura para un polipéptido recombinante sin tal modificación y/o que la constante de velocidad de asociación (K_a) del agente de captura para un polipéptido recombinante con un patrón o grado de modificación diferente.
- 15 31. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-28, en el que el agente de captura tiene una razón de especificidad de unión para un polipéptido recombinante que comprende una modificación con respecto a un polipéptido recombinante sin tal modificación y/o con relación a un polipéptido recombinante con un patrón o grado de modificación diferente de al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1 al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1 o al menos 40:1.
- 20 32. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-31, en el que el agente de captura es un agente de captura multivalente.
- 25 33. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-32, en el que el agente de captura distingue el polipéptido recombinante que comprende una modificación del mismo polipéptido pero sin la modificación.
- 30 34. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-33, en el que el agente de captura distingue el polipéptido recombinante que comprende una modificación del mismo polipéptido pero con un patrón o grado diferente de la misma modificación.
- 35 35. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-34, en el que el agente de captura es un anticuerpo.
- 40 36. El método según la realización 35, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-acetato, un anticuerpo anti-fosfato, un anticuerpo anti-lípido o un anticuerpo anti-hidrato de carbono, un anticuerpo anti-miristato, un anticuerpo anti-palmitato, un anticuerpo anti-isoprenoide como un anticuerpo anti-farnesol y anticuerpo contra geranilgeraniol, un anticuerpo anti-glicosilfosfatidilinositol (GPI), un anticuerpo anti-lipoato, un anticuerpo anti-flavina, un anticuerpo anti-hemo C, un anticuerpo anti-4'-fosfopanteteinilo, un anticuerpo anti-retinilideno, un anticuerpo anti-diftamida, un anticuerpo anti-etanolamina-fosfoglicerol, un anticuerpo anti-hipusina, un anticuerpo anti-acetilo, un anticuerpo anti-formilo, un anticuerpo anti-alquilo, un anticuerpo anti-metilo, un anticuerpo anti-amida, un anticuerpo anti-aminoácido, un anticuerpo anti-butilo, un anticuerpo anti-carboxilo, un anticuerpo anti-glicosilo, un anticuerpo anti-ácido polisialílico, un anticuerpo anti-hidroxiilo, un anticuerpo anti-malonilo, un anticuerpo anti-yodo, un anticuerpo anti-fosfato, un anticuerpo anti-adenililo, un anticuerpo anti-succinilo, un anticuerpo anti-sulfato, un anticuerpo anti-selenio, un anticuerpo anti-hidrato de carbono, un anticuerpo anti-polisacárido, un anticuerpo anti-almidón, un anticuerpo anti-hidroxi-etil-almidón (HES), un anticuerpo anti-azúcar, un anticuerpo anti-polietilenglicol (PEG), un anticuerpo anti-ubiquitina, un anticuerpo anti-pululano, un anticuerpo anti-quitosano, un anticuerpo anti-ácido hialurónico, un anticuerpo anti-sulfato de condroitina, un anticuerpo anti-sulfato de dermatano, un anticuerpo anti-dextrano, un anticuerpo anti-carboximetil-dextrano, un anticuerpo anti-poli(óxido de alquileo) (PAO), un anticuerpo anti-polialquilenglicol (PAG), un anticuerpo anti-polipropilenglicol (PPG), un anticuerpo anti-polioxazolina, un anticuerpo anti-poliacrilolmorfolina, un anticuerpo anti-poli(alcohol vinílico) (PVA), un anticuerpo anti-policarboxilato, un anticuerpo anti-polivinilpirrolidona (PVP), un anticuerpo anti-polifosfazeno, un anticuerpo anti-polioxazolina, un anticuerpo anti-polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, un anticuerpo anti-poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, un anticuerpo anti-poli(hidroximetilformal de 1-hidroximetileno) (PHF) o un anticuerpo anti-fosfato de 2-metacriloloxi-2'-etiltrimetilamonio (MPC).
- 50 37. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-36, en el que el polipéptido recombinante que comprende la modificación o el factor de coagulación recombinante que comprende la modificación es un factor II pegilado, un factor IIa pegilado, un factor II polisialilado, un factor IIa polisialilado, un factor II hesilado, un factor IIa hesilado, un factor II silado o un factor IIa silado.
- 55 38. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-36, en el que el polipéptido recombinante que comprende la modificación o el factor de coagulación recombinante que comprende la modificación es un
- 60
- 65

factor VII pegilado, un factor VIIa pegilado, un factor VII polisialilado, un factor VIIa polisialilado, un factor VII hesilado, un factor VIIa hesilado, un factor VII silado o un factor VIIa silado.

- 5 39. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-36, en el que el polipéptido recombinante que comprende la modificación o el factor de coagulación recombinante que comprende la modificación es un factor VIII pegilado, un factor VIIIa pegilado, un factor VIII polisialilado, un factor VIIIa polisialilado, un factor VIII hesilado, un factor VIIIa hesilado, un factor VIII silado o un factor VIIIa silado.
- 10 40. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-36, en el que el polipéptido recombinante que comprende la modificación o el factor de coagulación recombinante que comprende la modificación es un factor IX pegilado, un factor IXa pegilado, un factor IX polisialilado, un factor IXa polisialilado, un factor IX hesilado, un factor IXa hesilado, un factor IX silado o un factor IXa silado.
- 15 41. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-40, en el que el agente de captura está unido a un soporte sólido.
42. El método según la realización 41, en el que el soporte sólido es una placa de múltiples pocillos, una película, un tubo, una lámina, una columna o una micropartícula.
- 20 43. Un método para detectar la presencia de un factor VII recombinante pegilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluya el factor VII recombinante pegilado con un anticuerpo anti-PEG en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PEG al factor VII recombinante pegilado, formándose así un complejo factor VII-anticuerpo; purificar el complejo factor VII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VII recombinante y/o una actividad de factor VII, en el que la detección del factor VII y/o la actividad de factor VII es indicativa de la presencia del factor VII recombinante pegilado, en el que el factor VII recombinante pegilado es un factor VII y/o un factor VIIa.
- 25 44. Un método para detectar la presencia de un factor VII recombinante polisialilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluya el factor VII recombinante polisialilado con un anticuerpo anti-PSA en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PSA al factor VII recombinante polisialilado, formándose así un complejo factor VII-anticuerpo; purificar el complejo factor VII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VII recombinante y/o una actividad de factor VII, en el que la detección del factor VII y/o la actividad de factor VII es indicativa de la presencia del factor VII recombinante polisialilado, en el que el factor VII recombinante polisialilado es un factor VII y/o un factor VIIa.
- 30 45. Un método para detectar la presencia de un factor VII recombinante hesilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VII recombinante hesilado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor VII recombinante hesilado, formándose así un complejo factor VII-anticuerpo; purificar el complejo factor VII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VII recombinante y/o una actividad de factor VII, en el que la detección del factor VII y/o la actividad de factor VII es indicativa de la presencia del factor VII recombinante hesilado, en el que el factor VII recombinante hesilado es un factor VII y/o un factor VIIa.
- 35 46. Un método para detectar la presencia de un factor VII recombinante silado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VII recombinante silado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor VII recombinante silado, formándose así un complejo factor VII-anticuerpo; purificar el complejo factor VII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VII recombinante y/o una actividad de factor VII, en el que la detección del factor VII y/o la actividad de factor VII es indicativa de la presencia del factor VII recombinante silado, en el que el factor VII recombinante silado es un factor VII y/o un factor VIIa.
- 40 47. Un método para detectar la presencia de un factor VIII recombinante pegilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VIII recombinante pegilado con un anticuerpo anti-PEG en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PEG al factor VIII recombinante pegilado, formándose así un complejo factor VIII-anticuerpo; purificar el complejo factor VIII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VIII recombinante y/o una actividad de factor VIII, en el que la detección del factor VIII y/o la actividad de factor VIII es indicativa de la presencia del factor VIII recombinante pegilado, en el que el factor VIII recombinante pegilado es un factor VIII y/o un factor VIIIa.
- 45 48. Un método para detectar la presencia de un factor VIII recombinante polisialilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VIII recombinante polisialilado con un anticuerpo anti-PSA en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PSA al factor VIII recombinante polisialilado, formándose así un complejo factor VIII-anticuerpo; purificar el complejo factor VIII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VIII recombinante
- 50 55 60 65

y/o una actividad de factor VIII, en el que la detección del factor VIII y/o la actividad de factor VIII es indicativa de la presencia del factor VIII recombinante polisialilado, en el que el factor VIII recombinante polisialilado es un factor VIII y/o un factor VIIIa.

- 5 49. Un método para detectar la presencia de un factor VIII recombinante hesilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VIII recombinante hesilado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor VIII recombinante hesilado, formándose así un complejo factor VIII-anticuerpo; purificar el complejo factor VIII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VIII recombinante y/o una actividad de factor VIII, en el que la detección del factor VIII y/o la actividad de factor VIII es indicativa de la presencia del factor VIII recombinante hesilado, en el que el factor VIII recombinante hesilado es un factor VIII y/o un factor VIIIa.
- 10
- 15 50. Un método para detectar la presencia de un factor VIII recombinante silado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VIII recombinante silado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor VIII recombinante silado, formándose así un complejo factor VIII-anticuerpo; purificar el complejo factor VIII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VIII recombinante y/o una actividad de factor VIII, en el que la detección del factor VIII y/o la actividad de factor VIII es indicativa de la presencia del factor VIII recombinante silado, en el que el factor VIII recombinante silado es un factor VIII y/o un factor VIIIa.
- 20
- 25 51. Un método para detectar la presencia de un factor IX recombinante pegilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor IX recombinante pegilado con un anticuerpo anti-PEG en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PEG al factor IX recombinante pegilado, formándose así un complejo factor IX-anticuerpo; purificar el complejo factor IX-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor IX recombinante y/o una actividad de factor IX, en el que la detección del factor IX y/o la actividad de factor IX es indicativa de la presencia del factor IX recombinante pegilado, en el que el factor IX recombinante pegilado es un factor IX y/o un factor IXa.
- 30
- 35 52. Un método para detectar la presencia de un factor IX recombinante polisialilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor IX recombinante polisialilado con un anticuerpo anti-PSA en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PSA al factor IX recombinante polisialilado, formándose así un complejo factor IX-anticuerpo; purificar el complejo factor IX-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor IX recombinante y/o una actividad de factor IX, en el que la detección del factor IX y/o la actividad de factor IX es indicativa de la presencia del factor IX recombinante polisialilado, en el que el factor IX recombinante polisialilado es un factor IX y/o un factor IXa.
- 40
- 45 53. Un método para detectar la presencia de un factor IX recombinante hesilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor IX recombinante hesilado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor IX recombinante hesilado, formándose así un complejo factor IX-anticuerpo; purificar el complejo factor IX-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor IX recombinante y/o una actividad de factor IX, en el que la detección del factor IX y/o la actividad de factor IX es indicativa de la presencia del factor IX recombinante hesilado, en el que el factor IX recombinante hesilado es un factor IX y/o un factor IXa.
- 50
- 55 54. Un método para detectar la presencia de un factor IX recombinante silado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor IX recombinante silado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor IX recombinante silado, formándose así un complejo factor IX-anticuerpo; purificar el complejo factor IX-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor IX recombinante y/o una actividad de factor IX, en el que la detección del factor IX y/o la actividad de factor IX es indicativa de la presencia del factor IX recombinante silado, en el que el factor IX recombinante silado es un factor IX y/o un factor IXa.
56. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-54, en el que la etapa de someter a ensayo se realiza usando un ensayo cualitativo o un ensayo cuantitativo.
57. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-55, en el que la etapa de someter a ensayo se realiza usando un ensayo *in vitro*, un ensayo basado en células, o un ensayo *in vivo*.
- 60 57. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-56, en el que la etapa de someter a ensayo se realiza usando un ensayo de polipéptido no específico o un ensayo de polipéptido específico.
58. El método según la realización 57, en el que el ensayo de polipéptido no específico es un ensayo de absorción de UV, un ensayo de Biuret o un ensayo de Bradford.
- 65 59. El método según la realización 57, en el que el ensayo de polipéptido específico es un ensayo

5 cromogénico, un ensayo colorimétrico, un ensayo cronométrico, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de electroquimioluminiscencia, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo fluorogénico, un ensayo de transferencia de energía por resonancia, un ensayo de polarización plana, un ensayo de citometría de flujo, un ensayo de base inmunológica o un ensayo de actividad.

- 5 60. El método según la realización 59, en el que el ensayo de actividad es un ensayo de actividad enzimática, un ensayo de actividad inhibitoria, un ensayo de actividad de coagulación o un ensayo de actividad de polimerización.
- 10 61. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-60, en el que la unión selectiva del agente de captura se produce a un pH neutro a alcalino.
62. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-61, en el que el polipéptido recombinante es un polipéptido terapéutico.
- 15 63. El método según la realización 63, en el que el polipéptido terapéutico es factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF), proteasa ADAMTS 13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón- α (IFN- α), interferón de consenso, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoyetina (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, polipéptido similar a angiopoyetina 1 (ANGPTL1), polipéptido similar a angiopoyetina (ANGPTL2), polipéptido similar a angiopoyetina 3 (ANGPTL3), polipéptido similar a angiopoyetina 4 (ANGPTL4), polipéptido similar a angiopoyetina 5 (ANGPTL5), polipéptido similar a angiopoyetina 6 (ANGPTL6), polipéptido similar a angiopoyetina 7 (ANGPTL7), vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína morfogénica ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea 8, proteína morfogénica ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica ósea 15, receptor IA de proteína morfogénica ósea, receptor IB de proteína morfogénica ósea, receptor II de proteína morfogénica ósea, factor neurotrófico derivado del cerebro, cardiotrofina 1, factor neutrófilo ciliar, receptor del factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 1, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 α , factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 β , factor de crecimiento de células endoteliales β , endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, epigen, epirregulina, agente atrayente de neutrófilos derivado del epitelio, factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de crecimiento de fibroblastos 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8, factor de crecimiento de fibroblastos 8b, factor de crecimiento de fibroblastos 8c, factor de crecimiento de fibroblastos 9, factor de crecimiento de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos 11, factor de crecimiento de fibroblastos 12, factor de crecimiento de fibroblastos 13, factor de crecimiento de fibroblastos 16, factor de crecimiento de fibroblastos 17, factor de crecimiento de fibroblastos 19, factor de crecimiento de fibroblastos 19, factor de crecimiento de fibroblastos 20, factor de crecimiento de fibroblastos 21, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor α 1 del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, receptor α 2 del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, proteína relacionada con el crecimiento, proteína relacionada con el crecimiento α , proteína relacionada con el crecimiento β , proteína relacionada con el crecimiento γ , factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor de crecimiento similar a insulina I, receptor del factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento similar a insulina II, proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor α del factor de inhibición de leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor del factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina 3, neurotrofina 4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento placentario 2, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, factor de crecimiento derivado de plaquetas AB, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor del factor de células madre, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento transformante β 1, factor de crecimiento transformante β 1.2, factor de crecimiento transformante β 2, factor de crecimiento transformante β 3, factor de crecimiento transformante β 5, factor de crecimiento transformante latente β 1, proteína I de unión a factor de crecimiento transformante β , proteína II de unión a factor de crecimiento transformante β , proteína III de unión a factor de crecimiento transformante β ,
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor tipo I del factor de necrosis tumoral, receptor tipo II del factor de necrosis tumoral, receptor del activador del plasminógeno de tipo urocinasa, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, lectina, ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del foliculo, hormona estimulante de la tiroides, activador del plasminógeno tisular, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuína, hormona leutinizante, estrógeno, insulina, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombopoyetina, urocinasa, integrina, trombina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo de los mismos.

- 5
- 10 64. Un kit que comprende uno o más componentes útiles para poner en práctica un método según una cualquiera de las realizaciones 1-64.
- 15 65. El kit según la reivindicación 64, en el que el uno o más componentes comprenden uno o más agentes de captura, uno o más soportes en fase sólida y/o uno o más reactivos necesarios para detectar la presencia y/o una actividad de un polipéptido recombinante.
- 20 66. El kit según la reivindicación 65, en el que el agente de captura se fija a la fase sólida.
67. El kit según una cualquiera de las realizaciones 64-66, en el que el kit comprende además un polipéptido recombinante que comprende una modificación útil como control positivo para el agente de captura y/o la etapa de someter a ensayo.

Ejemplos

- 25 Los siguientes ejemplos no limitativos se proporcionan con fines ilustrativos solamente para facilitar una comprensión más completa de realizaciones representativas que se contemplan ahora. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos de ninguna de las realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, incluidas las que pertenecen a los métodos de ensayos de actividad dependientes de modificación divulgados en el presente documento y los productos procesados usando estos métodos. En la medida en que los ejemplos incluyen contenido
- 30 que se encuentra fuera del alcance de la presente invención, se incluyen meramente con propósitos de referencia.

Ejemplo 1

MDAA para FVIII pegilado en PBS

- 35 Este ejemplo ilustra que puede realizarse un MDAA para FVIII pegilado en una disolución tamponada.

40 Para unir un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido, se diluyeron 1/50 en NaHCO_3 0,1 M- Na_2CO_3 pH 9,5, anticuerpos anti-PEG de conejo 0,43 mg/ml (B47-2061-1; Epitomics, Inc., Burlingame, CA), y se incubó en los pocillos de una placa F96 Maxisorp (100 μl /pocillo) a $0\text{ }^\circ\text{C} \pm 10\text{ }^\circ\text{C}$ durante la noche. Luego se lavaron las placas con un tampón de lavado que contenía solución salina tamponada con fosfato (PBS; NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{ H}_2\text{O}$ 1,26 g/l, pH nativo) y Tween 20 al 0,05 %. Entonces se bloquearon los pocillos de la placa mediante incubación de 200 μl /pocillo de tampón de dilución que comprendía PBS y albúmina sérica humana 10 mg/ml a $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 ± 10 minutos. Se lavaron entonces los pocillos bloqueados con

45 tampón de lavado.

50 Para unir selectivamente una muestra a un soporte sólido, se añadieron 100 μl de las siguientes muestras a un pocillo 1) una serie de dilución de patrón de FVIII recombinante pegilado preparado usando PBS que contenía albúmina sérica humana (HSA) 10 mg/ml o 2) una serie de dilución de plasma de referencia humano preparado usando PBS que contenía HSA 10 mg/ml. Se usó FVIII recombinante pegilado con un grado de pegilación de aproximadamente 2 y tuvo una actividad de FVIII:C de 2333 UI de FVIII/ml, medido con un método cromogénico, y contenía 56,2 μg /ml de PEG unido/ml. Se cargaron las muestras en la placa y se incubaron a de aproximadamente $18\text{ }^\circ\text{C}$ a aproximadamente $26\text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 ± 10 minutos. En estas condiciones, el FVIII recombinante pegilado se unió selectivamente al soporte sólido por medio de su resto PEG usando un anticuerpo anti-PEG. Luego se lavó la

55 placa 6 veces con tampón de lavado, seguido de incubación con 200 μl /pocillo de un tampón de dilución de FVIII que comprendía imidazol 3,4 g/l, NaCl 5,85 g/l; HSA 10 mg/ml, pH 7,4. Este equilibrio se realizó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Después de una etapa de lavado con tampón de lavado, se vaciaron los pocillos y se midió la actividad de FVIII con un ensayo cromogénico siguiendo el procedimiento cromogénico convencional usando el kit Immunochrom FVIII (Technoclone, GmbH, Viena, Austria). Se llenaron los pocillos con 20 μl de tampón de dilución de FVIII seguido de la adición secuencial de 20 μl de reactivo A y reactivo B. Se incubó la placa a $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos. Luego, se añadió disolución de sustrato precalentado (100 μl /pocillo) y se incubó a $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos. Finalmente, se detuvo la reacción añadiendo ácido acético al 20 % (40 μl /pocillo). Posteriormente, se midió la placa a 405 nm (longitud de onda de referencia 620 nm) con un lector ELISA.

- 65 La figura 1 muestra las curvas de concentración-respuesta obtenidas para la preparación de FVIII pegilado y una

preparación de plasma de referencia humano. La curva de dosis-respuesta obtenida para la preparación de FVIII pegilado, que cubre un intervalo de actividad de FVIII de 7,3 a 233 mUI/ml cumplió con los requisitos aceptados de exactitud, precisión y linealidad y, por tanto, se consideró apropiada para extrapolar muestras. En particular, el coeficiente de correlación de la curva de regresión log-log fue de 0,9993 con una exactitud media del 100,1 %, calculada como la concordancia relativa media de las concentraciones ajustadas de manera inversa con las nominales, y una precisión del 4,9 %, expresada como desviación estándar de esta media. Alternativamente, una curva de calibración basada en un análisis de regresión lin-lin también sería factible. En este caso, la curva de calibración de 4 puntos varió solo de 2 9,2 a 233 mUI/ml con una exactitud media del 104,4 % y una precisión del 6,2 %. Estos datos favorecen el enfoque log-log para construir la curva de calibración porque este enfoque proporciona una mayor sensibilidad junto con una mayor exactitud y precisión. Además, los datos demostraron la especificidad absoluta del enfoque para medir FVIII modificado solamente. El plasma de referencia humano, que contenía FVIII humano nativo no modificado a una concentración de 1 UI/ml, no produjo ninguna señal sustancial. Estos datos demostraron que la actividad de FVIII del FVIII pegilado puede medirse de manera sensible y específica.

15 Ejemplo 2

MDAA para FVIII pegilado en plasma humano

Este ejemplo ilustra que puede realizarse un MDAA para FVIII pegilado en la presencia de plasma sanguíneo.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 1, excepto en que se usaron 100 μ l/pocillo de disolución de anticuerpo de recubrimiento que comprendía anticuerpos anti-PEG de conejo 4 μ g/ml (B47-2061-1; Epitomics, Inc., Burlingame, CA), NaHCO_3 0,1 M- Na_2CO_3 , pH 9,5.

Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 1, excepto en que 1) se preparó una primera serie de dilución de FVIII pegilado recombinante mediante dilución en PBS que contenía leche desnatada 30 mg/ml para obtener una serie de dilución de 1/10 000 a 1/320 000; 2) se preparó una segunda serie de dilución de FVIII pegilado recombinante mediante dilución en plasma humano; y 3) se midió la actividad de FVIII en el ensayo cromogénico usando un tiempo de incubación de 15 minutos para la reacción del sustrato a $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$.

La figura 2 muestra las curvas de dosis-respuesta para las dos preparaciones con diferentes purezas. Las dos curvas de concentración-respuesta fueron muy similares tal como se muestra mediante sus pendientes, que diferían en menos del 1 %. Estos datos demostraron que el ensayo de actividad dependiente de modificación para FVIII pegilado se realizó adecuadamente en plasma humano, cuando se diluyó 1/200. El FVIII no pegilado, contenido en el plasma, no contribuyó a la señal tal como se muestra mediante las curvas de concentración-respuesta solapantes.

Ejemplo 3

Exactitud y precisión de MDAA para FVIII pegilado

Este ejemplo ilustra la exactitud y la precisión de un MDAA para FVIII pegilado.

Para unir un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido, se incubaron 100 μ l/pocillo de disolución de anticuerpo de recubrimiento que comprendía anticuerpos anti-PEG de conejo 4 μ g/ml (B47-2061-1; Epitomics, Inc., Burlingame, CA), NaHCO_3 0,1 M- Na_2CO_3 , pH 9,5 en los pocillos de una placa F96 Maxisorp a $0\text{ }^\circ\text{C} \pm 10\text{ }^\circ\text{C}$ durante la noche. Luego se lavaron las placas con tampón de lavado que comprendía PBS y Tween 20 al 0,05 %. Entonces se bloquearon los pocillos de la placa mediante incubación de 200 μ l/pocillo de tampón de bloqueo que contenía PBS, leche desnatada al 3 % y benzamidina 50 mM a de aproximadamente $18\text{ }^\circ\text{C}$ a aproximadamente $26\text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 ± 10 minutos. Se lavaron entonces los pocillos bloqueados con tampón de lavado.

Para unir selectivamente una muestra a un soporte sólido, se añadieron 100 μ l de las siguientes muestras a un pocillo 1) una serie de dilución de FVIII pegilado recombinante preparado usando disolución de plasma humano 1/10 diluida con PBS, leche desnatada al 3 % y benzamidina 50 mM y cubría un intervalo de concentración de FVIII de 2,2 mU/ml a 69 mU/ml; 2) una serie de dilución de plasma humano preparado usando una disolución de plasma humano 1/10 diluida con PBS, leche desnatada al 3 % y benzamidina 50 mM; o 3) se usó una serie de dilución de un control de prueba preparado con disolución de plasma humano 1/10 diluida con PBS, leche desnatada al 3 % y benzamidina 50 mM, de FVIII recombinante pegilado con un grado de pegilación de aproximadamente 2 y tuvo una actividad de FVIII:C de 2333 UI de FVIII/ml, medido con un método cromogénico, y contenía 56,2 μ g/ml de PEG unido/ml. Se cargaron las muestras en la placa y se incubaron a de aproximadamente $18\text{ }^\circ\text{C}$ a aproximadamente $26\text{ }^\circ\text{C}$ durante 120 ± 10 minutos. En estas condiciones, el FVIII recombinante pegilado se unió selectivamente al soporte sólido por medio de su resto PEG usando un anticuerpo anti-PEG. Luego se lavó la placa 6 veces con tampón de lavado, seguido de incubación con 200 μ l/pocillo de un tampón de dilución de FVIII que comprendía imidazol 3,4 g/l, NaCl 5,85 g/l; HSA 10 mg/ml, pH 7,4. Este equilibrio se realizó a de aproximadamente $18\text{ }^\circ\text{C}$ a

aproximadamente 26 °C durante 5-10 minutos.

Después de una etapa de lavado con tampón de lavado, se vaciaron los pocillos y se midió la actividad de FVIII con un ensayo cromogénico siguiendo el procedimiento cromogénico convencional usando el kit ImmunoChrom FVIII (Technoclone, GmbH, Viena, Austria). Se llenaron los pocillos con 20 µl de tampón de dilución de FVIII seguido de la adición secuencial de 20 µl de reactivo A y reactivo B. Se colocó la placa en un dispositivo de mezclado ajustado a 500 rpm y se incubó a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 15 minutos. Luego se añadieron 100 µl/pocillo de disolución de sustrato y se incubaron a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 45 minutos. Finalmente, se detuvo la reacción añadiendo 40 µl/pocillo de ácido acético al 20 %. Se miden las densidades ópticas (DO) en un lector ELISA a 405 nm (longitud de onda de referencia 620 nm). La evaluación cuantitativa se basa en una curva de calibración doble logarítmica. Las DO medias corregidas para el blanco de los patrones de curva de calibración individuales se correlacionarán con sus concentraciones de FVIII. La curva de calibración resultante se usa para calcular las concentraciones de FVIII de las muestras cuando sus DO están dentro del intervalo de DO cubierto por la curva de calibración. Tres analistas diferentes participaron en este estudio para verificar la influencia dependiente del operador.

La tabla 1 muestra las medias (n = 24) de los datos originales de las curvas de calibración y sus características. En particular, proporciona la media de DO corregidas para el blanco medidas para los seis patrones de curva de calibración D1 a D6, que tenían concentraciones de FVIII que variaban de 2,2 mU/ml a 69 mU/ml, y los blancos correspondientes. Además de estas lecturas de ensayo directas, se muestran las características de la curva de calibración, la pendiente, la ordenada en el origen y el coeficiente de correlación de las curvas de calibración resultantes. Finalmente, se proporciona el error total relativo (RTE), una medida combinada de exactitud y precisión del ajuste de la curva. Se calculó RTE ajustando las DO medidas para cada curva de calibración. Las concentraciones así obtenidas se multiplicaron por el factor de dilución y finalmente se promediaron para obtener la concentración media ajustada de manera inversa. RTE fue entonces la suma de la diferencia absoluta entre la concentración nominal y la concentración media ajustada de manera inversa del patrón de ensayo y la doble desviación estándar de la concentración media ajustada de manera inversa, expresada como un porcentaje de la

concentración nominal $(RTE = (|x_n - \bar{x}_m| + 2 \times SD) / \bar{x}_m \times 100)$; \bar{x}_n y \bar{x}_m representan la media nominal y la medida, respectivamente, y SD la desviación estándar de \bar{x}_m .

Tabla 1. Datos originales medios y características de la curva de calibración para MDAA de FVIII pegilado											
Característica	D1	D2	D3	D4	D5	D6	Blanco	Pendiente	Ordenada	r	RTE
Media	1,984	1,051	0,540	0,270	0,130	0,065	0,176	0,9974	-1,528	0,9994	8,3
RSD	18,3	22,9	25,0	26,5	27,1	27,8	6,6	3,7	-8,3	n.a.	n.a.

n.a. significa no aplicable.

Las lecturas directas individuales, es decir, las DO corregidas para el blanco, mostraron una cierta variabilidad pero aceptable entre los diferentes ensayos con RSD de desde el 18,3 % hasta el 27,8 % para las DO corregidas para el blanco medidas para los patrones de calibración de ensayo individuales D1 a D6, mientras que el blanco mostró la RSD baja del 6,6 %. Para compensar estas diferencias en la lectura directa, la curva de calibración se construye en cada placa individual. Las RSD bajas determinadas para la pendiente media y la ordenada en el origen media indicaron que las curvas de calibración resultantes tenían una forma muy similar a pesar de las diferencias en las DO medidas para los patrones de ensayo y verificaron que este procedimiento era eficiente para compensar las diferencias entre las lecturas absolutas. Por tanto, se hallaron RSD del 3,7 % y el 8,3 % para la pendiente media y la ordenada en el origen media de las curvas de calibración. Su linealidad fue adecuada, tal como se muestra mediante el coeficiente de correlación medio r = 0,9994, con todos los valores individuales no inferiores a 0,9978. Dado que el coeficiente de correlación puede ser una medida engañosa para la linealidad y la exactitud, también se calculó el RTE de las curvas. El RTE medio del 8,3 % confirmó los altos coeficientes de correlación como un indicador de la exactitud y la linealidad de las curvas de calibración. Los valores individuales para el RTE oscilaron entre el 2,0 % y el 17,6 %. El hecho de que solo 1 de 24 RTE era mayor del 15 % y 16 de 24 RTE menores del 10 % ilustró aún más la idoneidad del modelo de calibración doble logarítmica seleccionado para describir la relación entre la señal y la actividad de FVIII. Además, debe indicarse que la curva de calibración, aunque combina solo la parte pseudolineal de la relación dosis-respuesta, comprendía seis puntos individuales. Este diseño hace que la curva de calibración cumpla con las directrices de la EMA en la validación de métodos bioanalíticos, que requiere un número mínimo de seis puntos de calibración para los LBA independientemente del modelo de calibración seleccionado. Aunque se usó un modelo de evaluación lineal con un intervalo estrecho, estas curvas de calibración cumplieron no obstante con esta petición. La figura 3 muestra la curva de calibración media obtenida para 24 ejecuciones. La inserción concuerda con los patrones de calibración de ensayo ajustados de manera inversa como porcentaje de las concentraciones nominales respectivas. La directriz actual sobre la validación de métodos bioanalíticos requiere que el 75 % de las concentraciones ajustadas de manera inversa estén dentro de un intervalo de ± 20 %.

Las concentraciones medias ajustadas de manera inversa diferían en menos del 5 % para los seis patrones de curva de calibración. No hubo una tendencia a que los errores relativos dependiesen de la concentración de FVIII, sino una distribución estable en todo el intervalo de la curva de calibración. Cabe mencionar que el RE medio determinado para el patrón D6, que tiene la menor concentración de FVIII de 2,2 mU/ml, no difirió de las determinadas para los otros patrones de ensayo. Esto respalda claramente la medición de muestras con concentraciones de FVIII recombinante pegilado cerca del límite inferior de cuantificación donde solo una dilución de la muestra producirá una señal dentro del intervalo cubierto por la curva de calibración. Los RE individuales estaban dentro de un intervalo de $\pm 12\%$ y, por tanto, cumplían con el criterio de aceptación del protocolo de validación.

En general, todos los datos confirmaron la exactitud, la precisión y la robustez de la construcción de las curvas de calibración para el MDAA para medir el FVIII recombinante pegilado.

Ejemplo 4

Especificidad de MDAA para FVIII pegilado

Este ejemplo ilustra cómo confirmar la especificidad de un MDAA para FVIII pegilado usando un ensayo de competencia.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 3.

Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 3, excepto en que las muestras de FVIII pegilado recombinante se diluyeron hasta una concentración de 69 mU/ml y luego se mezclaron 1+1 con PEG 5000 para lograr concentraciones finales de PEG 5000 que oscilaron entre 100 $\mu\text{g/ml}$ y 0,012 $\mu\text{g/ml}$ (14 diluciones).

Se midió cada muestra de competencia cuatro veces en una ejecución. Las señales medias obtenidas se relacionaron luego de manera inversa con las obtenidas a partir de muestras que no contienen competidores con señales relativas calculadas. La figura 4 muestra la curva de competencia obtenida mediante este enfoque y además proporciona la CI_{50} , es decir, la concentración de PEG 5000 que proporciona la mitad de la competencia máxima, y el intervalo de confianza correspondiente $IC_{95\%}$, calculado para esta CI_{50} usando el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad. Los datos confirmaron claramente la especificidad de la etapa de captura porque se determinó una reducción claramente dependiente de la dosis de la señal medida en presencia de PEG 5000. Se alcanzó la competencia máxima media en las condiciones de ensayo dadas mediante una concentración de PEG de 2,4 $\mu\text{g/ml}$.

Ejemplo 5

Especificidad de MDAA para FVIII pegilado

Este ejemplo ilustra la especificidad de un MDAA para FVIII pegilado usando un ensayo de competencia.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 3.

Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 3, excepto en que 1) se diluyeron las muestras de FVIII pegilado recombinante hasta una concentración de 40 mU/ml y luego se mezclaron 1+1 con anticuerpos anti-PEG de conejo (PEG-B-47; Epitomics, Inc., Burlingame, CA) para lograr concentraciones finales que oscilaron entre 605 $\mu\text{g/ml}$ y 0,00007 $\mu\text{g/ml}$.

Se midió cada muestra de competencia dos veces en una ejecución. Las señales medias obtenidas se relacionaron luego de manera inversa con las obtenidas a partir de muestras que no contenían competidores con señales relativas calculadas. La figura 5 muestra la curva de competencia obtenida mediante este enfoque y además proporciona la CI_{50} , es decir, la concentración de anticuerpo que proporciona la mitad de la competencia máxima, y el intervalo de confianza correspondiente $IC_{95\%}$, calculado para esta CI_{50} usando el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad. Se halló una curva de competencia común, caracterizada por el buen coeficiente de determinación $R^2 = 0,9969$. Una concentración de anticuerpo anti-PEG de 0,095 $\mu\text{g/ml}$ provocó la reducción a la mitad de la máxima de la señal en las condiciones de ensayo dadas y confirmó la selectividad de la etapa de captura.

Ejemplo 6

Exactitud y precisión de MDAA para FVIII pegilado en plasma

Este ejemplo ilustra la exactitud y la precisión de un MDAA para FVIII pegilado en plasma usando un ensayo de

recuperación con adiciones conocidas.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 3.

5 Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 3, excepto en que 1) se añadió a muestras que comprendían plasma humano normal (NHP) cantidades conocidas de FVIII recombinante pegilado a cinco concentraciones que oscilaron entre 0,07 y 2 U/ml; o 2) las muestras comprendían ocho muestras de plasma deficiente en FVIII disponibles comercialmente y se midieron antes y después de añadirse cantidades conocidas de FVIII recombinante pegilado a 0,07 U/ml y 0,5 U/ml. Los ocho plasmas deficientes en FVIII se obtuvieron de George King Bio-Medical Inc. (Chelsea, MA): GK897-1966 (n.º 1), GK892-2056 (n.º 2), GK896-2031 (n.º 3), Pool-1928 (n.º 4), Pool-1930 (n.º 5), GK893-1964 (n.º 6), GK895-1959 (n.º 7) y GK894-1965 (n.º 8).

15 Se determinó la precisión intraejecución ($n = 6$) y la precisión interejecución ($n = 6$) para muestras de plasma con adiciones conocidas y tampón, mientras que se determinó la precisión del ensayo calculando la recuperación de las cantidades conocidas añadidas. Finalmente, se calculó el error total como la suma de la exactitud y precisión interejecución. La directriz actual de la EMA establece que este error total no debe superar el 30 % o el 40 % en el límite inferior de cuantificación del ensayo (LLOQ). La tabla 2 resume los datos descritos anteriormente.

Tabla 2. Precisión y exactitud de MDAA para FVIII pegilado

Concentración nominal	Precisión interejecución		Precisión intraejecución		Exactitud		Error total	
	NHP	Tampón	NHP	Tampón	NHP	Tampón	NHP	Tampón
0,07	9,3	13,2	n.d.	n.d.	91,5	101,4	17,7	14,7
0,25	10,0	6,5	n.d.	n.d.	95,4	99,3	14,6	7,1
0,5	7,2	5,6	5,1	3,7	95,0	105,8	12,2	11,4
1,0	8,4	6,5	n.d.	n.d.	96,9	103,2	11,6	9,7
2,0	7,8	7,1	n.d.	n.d.	99,6	107,2	8,2	14,2

n.d. significa no realizado.

20 Se obtuvieron datos de alta calidad determinando la exactitud y precisión del ensayo en plasma humano normal y en matriz de tampón. Además, el error total del MDAA para FVIII recombinante pegilado fue claramente menor del 20 %, incluso en el LLOQ del ensayo de 0,07 U/ml. Estos datos calificaron el MDAA para FVIII recombinante pegilado como un método preciso y exacto, adecuado para su uso como método bioanalítico.

25 La tabla 3 muestra los resultados del estudio de recuperación de adiciones conocidas realizado en ocho muestras de plasma deficientes en FVIII. La recuperación de FVIII recombinante pegilado con adiciones conocidas también fue buena en las muestras de plasma deficientes en FVIII. Se detectaron recuperaciones promedio del 91,3 % y el 98,5 % cuando se añadieron cantidades conocidas de FVIII/ml recombinante pegilado de 0,07 U/ml y 0,5 U/ml, respectivamente. La figura 6 muestra las curvas representativas para cuatro de las ocho muestras de plasma deficientes en FVIII, con adiciones conocidas con 0,5 U/ml. El alto paralelismo de las curvas de las muestras con adiciones conocidas con las del patrón de ensayo es evidente: las pendientes obtenidas para las curvas de las muestras con adiciones conocidas diferían en menos de ± 10 % de las curvas de calibración del ensayo, lo que indica una excelente linealidad de las curvas de dosis-respuesta obtenidas para las muestras de plasma con deficiencia de FVIII con adiciones conocidas.

Tabla 3. Recuperación en muestras de plasma deficientes en FVIII

N.º de lote	Artículo	Adición conocida 1	Adición conocida 2	N.º de lote	Artículo	Adición conocida 1	Adición conocida 2
GK897-1966	N.º 1	85,5	100,0	Pool-1930	N.º 5	92,8	110,2
GK892-2056	N.º 2	98,6	95,9	GK893-1964	N.º 6	87,0	93,9
GK896-2031	N.º 3	89,9	93,9	GK895-1959	N.º 7	97,1	95,9
Pool-1928	N.º 4	88,4	104,1	GK894-1965	N.º 8	91,3	93,9

Ejemplo 7

40 MDAA para FVIII polisialilado en PBS o plasma humano

Este ejemplo ilustra que puede realizarse un MDAA para FVIII polisialilado en una disolución tamponada o en la presencia de plasma sanguíneo.

5 Para unir un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido, se incubaron 100 µl/pocillo de disolución de anticuerpo de recubrimiento que comprendía una dilución 1/400 de anticuerpos NCAM anti-ácido polisialílico de ratón (clon 2-2B de MAB5324; Millipore, Inc.), NaHCO₃ 0,1 M-Na₂CO₃, pH 9,5 en los pocillos de una placa F96 Maxisorp a 0 °C ± 10 °C durante la noche. Luego se lavaron las placas con tampón de lavado que comprendía PBS y Tween 20 al 0,05 %. Entonces se bloquearon los pocillos de la placa mediante incubación de 10 200 µl/pocillo de tampón de dilución que comprendía PBS y albúmina sérica humana 10 mg/ml a 37 °C ± 5 °C durante 60 ± 10 minutos. Se lavaron entonces los pocillos bloqueados con tampón de lavado.

15 Para unir selectivamente una muestra a un soporte sólido, se añadieron 100 µl de las siguientes muestras a un pocillo 1) una serie de dilución de 1/40 000 a 1/1 280 000 de patrón de FVIII recombinante polisialilado preparado usando PBS que contenía HSA 10 mg/ml o 2) una serie de dilución de 1/20 a 1/320 de plasma de referencia humano preparado usando PBS que contenía HSA 10 mg/ml. Se preparó FVIII recombinante polisialilado uniendo un reactivo de ácido polisialílico de 20 kDa que contenía un grupo aminoóxido activo a los N-glicanos oxidados de FVIII, véanse las publicaciones estadounidenses n.ºs 20110027350 y 20110028693. La preparación tenía una actividad de FVIII:C de 3110 UI de FVIII/ml, medida con un método cromogénico, y contenía ácido N-acetilneuramínico 483 µg/ml que dio como resultado un grado de polisialilación de aproximadamente 7-8. Se cargaron las muestras en la placa y se 20 incubaron a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 60 ± 10 minutos. En estas condiciones, el FVIII recombinante polisialilado se unió selectivamente al soporte sólido por medio de su resto de ácido polisialílico (PSA) usando un anticuerpo anti-PSA. Luego se lavó la placa 6 veces con tampón de lavado, seguido de incubación con 200 µl/pocillo de un tampón de dilución de FVIII que comprendía imidazol 3,4 g/l, NaCl 5,85 g/l; HSA 10 mg/ml, pH 7,4. Este equilibrio se realizó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Después de una etapa de lavado con 25 tampón de lavado, se vaciaron los pocillos y se midió la actividad de FVIII con un ensayo cromogénico siguiendo el procedimiento cromogénico convencional usando el kit Immunochrom FVIII (Technoclone, GmbH, Viena, Austria). Se llenaron los pocillos con 20 µl de tampón de dilución de FVIII seguido de la adición secuencial de 20 µl de reactivo A y reactivo B. Luego se incubó la placa a 37 °C ± 5 °C durante 5 minutos. Luego, se añadió disolución de sustrato precalentado (100 µl/pocillo) y se incubó a 37 °C ± 5 °C durante 15 minutos. Finalmente, se detuvo la 30 reacción añadiendo ácido acético al 20 % (40 µl/pocillo). Posteriormente, se midió la placa a 405 nm (longitud de onda de referencia 620 nm) con un lector ELISA.

35 La figura 7 muestra la curva de concentración-respuesta obtenida para la preparación de FVIII polisialilado en un intervalo de actividad de FVIII de 2,4 a 78 mUI/ml. La curva de concentración-respuesta para el FVIII polisialilado mostró una buena linealidad en todo el intervalo de concentración del FVIII después de la transformación logarítmica. Esto se demostró mediante el coeficiente de correlación $r = 0,9989$ y se respaldó por las concentraciones ajustadas de manera inversa calculadas para los puntos individuales de la curva de calibración, que diferían en menos del 12 % (intervalo: del 89,8 % al 108,5 %; media del 100,2 %) de los nominales en todo el intervalo. Además, los datos confirmaron la especificidad del MDAA porque el plasma humano, que contenía FVIII 40 no modificado, no mostró ninguna respuesta cuando se midió a concentraciones de FVIII similares a las del FVIII polisialilado.

45 La influencia del plasma humano en el MDAA se investigó más a fondo midiendo la respuesta para el FVIII polisialilado diluido en plasma humano, que se prediluyó 1/200. La tabla 4 compara directamente las densidades ópticas (DO) medias corregidas para el blanco medidas para el FVIII polisialilado diluido en tampón y en plasma humano. También proporciona las concentraciones de FVIII ajustadas de manera inversa para las dos series de dilución en tampón y plasma humano, respectivamente, y la concordancia con las concentraciones nominales de FVIII, facilitada como un porcentaje de las concentraciones nominales.

		FVIII polisialilado en tampón			FVIII polisialilado en plasma		
Dilución	mU/ml	DO	Adaptado (mUI/ml)	% nominal	DO	Lectura (mUI/ml)	% nominal
40.000	7 7,7	1,715	7 9,8	102,6	1,786	8 3,6	107,6
80.000	3 8,9	0,911	3 8,1	98,1	1,016	4 3,3	111,4
160.000	1 9,4	0,510	1 9,4	99,7	0,532	2 0,3	104,7
320.000	9,7	0,290	1 0,0	103,2	0,274	9,4	96,6
640.000	4,9	0,142	4,4	8 9,8	0,157	4,9	100,9
1.280.000	2,4	0,092	2,6	107,5	0,089	2,5	104,1
Pendiente		0,8571			0,8762		

Tabla 4. MDAA para FVIII polisialilado en tampón y en plasma humano							
		FVIII polisialilado en tampón			FVIII polisialilado en plasma		
Dilución	mU/ml	DO	Adaptado (mUI/ml)	% nominal	DO	Lectura (mUI/ml)	% nominal
% de pendiente		100,0			102,2		

Las curvas de concentración-respuesta obtenidas para la preparación de FVIII polisialilada fueron muy similares en tampón y en plasma humano, tal como se demuestra mediante sus pendientes que diferían en menos del 3 %. La recuperación de la actividad de FVIII polisialilado en plasma humano fue tan buena como en tampón. La recuperación media fue del 104,2 % con valores individuales entre el 96,6 y el 111,4 % para la preparación polisialilada diluida en plasma humano y del 100,2 % para la misma preparación diluida en tampón. Estos datos demostraron que el ensayo de actividad dependiente de modificación para el FVIII polisialilado se realizó adecuadamente en plasma humano, cuando se diluyó 1/200. El FVIII no polisialilado, contenido en plasma, no contribuyó a la señal, lo que demuestra la especificidad absoluta del MDAA para el FVIII polisialilado tal como se esperaba.

Ejemplo 8

MDAA para FVIII polisialilado en plasma de diferentes especies animales

Este ejemplo ilustra que puede realizarse un MDAA para FVIII polisialilado en presencia de plasma sanguíneo.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 7.

Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 7, excepto en que 1) se preparó FVIII polisialilado recombinante mediante dilución 1/20 000 con PBS que contenía HSA 10 mg/ml y benzamidina 50 mM, luego además 1+1 con muestras de plasma prediluidas 1/5 de diferentes especies y finalmente 1+1 directamente en la placa (la concentración final de plasma correspondió a una dilución de 1/20); y 2) las preparaciones se diluyeron con plasma de las siguientes especies: rata, ratón, ratón deficiente en FVIII, macaco cangrejero y plasma de referencia humano.

La figura 8 muestra las curvas de concentración-respuesta obtenidas para el FVIII polisialilado en las diferentes matrices de plasma y proporciona sus pendientes con respecto a la determinada en tampón. Se obtuvieron curvas de concentración-respuesta lineales para las muestras de plasma investigadas. Además, estas curvas eran muy paralelas a las obtenidas en tampón y sus pendientes diferían solo marginalmente, es decir, menos del 4 % de la determinada en tampón. Por tanto, estos datos demostraron que el plasma de las diferentes especies investigadas no interfirió con el MDAA para el FVIII polisialilado cuando se diluyó 1/20. Además, estos datos respaldan la preparación de la curva de calibración MDAA en tampón de dilución y el uso de esta serie de diluciones para medir muestras de plasma.

Ejemplo 9

Rendimiento y sensibilidad del MDAA para el FVIII polisialilado

Este ejemplo ilustra el rendimiento y la sensibilidad de un MDAA para el FVIII polisialilado usando un ensayo de recuperación con adiciones conocidas.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 7.

Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 7, excepto en que se disolvió FVIII recombinante polisialilado liofilizado para producir una disolución con 250 UI/ml y se diluyó con tampón de dilución que comprendía PBS, Tween 20 al 0,05 %, HSA 10 mg/ml y benzamidina 50 mM a concentraciones nominales de FVIII de 10, 5, 2,5, 1 y 0,5 UI/ml, luego además 1/10 con plasma de rata seguido de una dilución 1/10 con tampón. Entonces se diluyeron adicionalmente estas muestras 1+1 directamente en la placa, produciendo una concentración final en plasma de rata correspondiente a una dilución de 1/20. Además, se midió la actividad de FVIII en el ensayo cromogénico usando un tiempo de incubación de 15 minutos para los reactivos de sustrato y un tiempo de incubación de 45 minutos para la disolución de sustrato.

La figura 9 muestra las curvas de concentración-respuesta para estas muestras que contienen concentraciones de FVIII polisialiladas que oscilan entre 1 y 0,05 UI/ml. Las curvas de concentración-respuesta de las muestras de plasma de rata con adiciones conocidas fueron lineales y paralelas a las obtenidas para el patrón de ensayo diluido en tampón cuando contenían más de tres puntos de datos. En tales casos, las pendientes diferían en menos del 7 % de las de la serie de dilución determinadas para la muestra que contenía solo tampón. Incluso la muestra con adiciones conocidas de 0,05 UI/ml de FVIII polisialilado mostró una curva de concentración-respuesta lineal. Su

pendiente difirió solo en un 13,5 % de la de la muestra de tampón, lo que demuestra que el MDAA se realizó adecuadamente en plasma de rata también en concentraciones muy bajas de FVIII polisialilado, cerca del límite de cuantificación presumiblemente. Las recuperaciones de FVIII polisialilado con adiciones conocidas se encontraban dentro de un intervalo de 100 ± 20 % de las concentraciones nominales. Estos datos demostraron que el MDAA para el FVIII polisialilado se realizó de manera aceptable en muestras de plasma de rata a una dilución mínima de 1/20.

Ejemplo 10

Exactitud y precisión de MDAA para FVIII polisialilado

Este ejemplo ilustra la exactitud y la precisión de un MDAA para el FVIII polisialilado.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 7.

Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 9.

La tabla 5 proporciona los datos originales y las características de la curva de calibración, que se obtuvieron para 16 curvas de calibración, construidas en días diferentes. Las densidades ópticas (DO) corregidas para el blanco de los calibradores D1 a D5, que cubren el intervalo de actividad de FVIII polisialilado de 1,6 a 25 uIU/ml, blanco, pendiente, ordenada en el origen, coeficiente de correlación r y error total relativo (RTE). Se calculó RTE de acuerdo con $RTE = (| \bar{x}_N - \bar{x}_M | + 2SD) / \bar{x}_M \times 100$. \bar{x}_N y \bar{x}_M representan la media nominal y la medida, respectivamente, y SD la desviación estándar de \bar{x}_M . Para obtener la media \bar{x}_M , las DO medias de las diluciones individuales se ajustaron de manera inversa en la curva, se normalizaron mediante la multiplicación por la dilución respectiva y finalmente se promediaron.

N.º de prueba	D1	D2	D3	D4	D5	Blanco	Pendiente	Ordenada	r	RTE
AE-0501	0,488	0,256	0,135	0,067	0,029	0,137	1,0076	-1,699	0,9983	12,8
AE-0502	0,391	0,210	0,104	0,047	0,025	0,132	1,0145	-1,809	0,9993	8,5
AE-0503	0,386	0,212	0,110	0,048	0,024	0,129	1,0227	-1,814	0,9983	13,0
AE-0504	0,424	0,233	0,131	0,066	0,032	0,129	0,9272	-1,651	0,9988	10,9
AE-0491	0,480	0,270	0,146	0,074	0,039	0,139	0,9117	-1,579	0,9995	6,7
AE-0492	0,413	0,233	0,131	0,067	0,041	0,134	0,8460	-1,566	0,9992	8,7
AE-0493	0,448	0,228	0,127	0,064	0,034	0,134	0,9324	-1,654	0,9998	4,7
AE-0494	0,456	0,247	0,127	0,063	0,033	0,142	0,9604	-1,672	0,9998	4,9
AE-0521	0,403	0,221	0,125	0,069	0,036	0,142	0,8652	-1,602	0,9998	4,4
AE-0522	0,400	0,207	0,116	0,060	0,031	0,141	0,9221	-1,686	0,9997	5,4
AE-0523	0,427	0,237	0,129	0,062	0,038	0,140	0,8950	-1,616	0,9988	10,6
AE-0524	0,438	0,247	0,136	0,074	0,039	0,141	0,8727	-1,570	0,9998	4,1
AE-0531	0,488	0,283	0,161	0,087	0,049	0,143	0,8361	-1,471	0,9998	4,6
AE-0532	0,383	0,215	0,119	0,062	0,038	0,142	0,8468	-1,602	0,9991	9,1
AE-0533	0,454	0,252	0,138	0,071	0,039	0,144	0,8954	-1,586	0,9997	5,0
AE-0534	0,452	0,249	0,143	0,077	0,043	0,142	0,8521	-1,535	0,9999	3,2
Media	0,433	0,237	0,130	0,066	0,035	0,138	0,9130	-1,632	0,9994	7,3
RSD	8,2	9,3	10,8	15,2	18,6	3,6	6,8	-5,6	n.a.	n.a.

n.a. significa no aplicable.

Las DO medias de los cinco calibradores mostraron RSD aceptables que fueron inversamente proporcionales a sus concentraciones, pero todavía no mayores del 20 %, también para la menor concentración de FVIII. Las curvas de calibración tenían RSD medios del 6,8 % y el 5,6 % para la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente. Además, su linealidad fue aceptablemente buena con coeficientes de correlación mayores de 0,9983 y RTE menores del 13,0 %.

La figura 10 muestra la curva de calibración media. Los datos demostraron la robustez del ensayo y demostraron que la curva de calibración podía construirse con una repetibilidad aceptable. La exactitud de estas curvas se verificó una vez más, ajustando las DO medidas y calculando la concordancia con los valores nominales. La figura 11 muestra estos datos para los cinco calibradores de las curvas individuales que ilustran que las concentraciones ajustadas de manera inversa estaban dentro de un intervalo de $\pm 10\%$ de las nominales en todo el intervalo.

Ejemplo 11

Detección de FVIII polisialilado a partir de una muestra de sangre usando MDAA

Este ejemplo ilustra la detección *in vivo* de una proteína sanguínea usando un MDAA.

Se preparó FVIII recombinante polisialilado tal como se describe en el ejemplo 7. La preparación tenía una actividad FVIII:C de 3110 UI de FVIII/ml, medida con un método cromogénico, y contenía ácido N-acetilneuramínico 483 $\mu\text{g/ml}$, lo que dio como resultado un grado de polisialilación de aproximadamente 7-8. Se administró FVIII recombinante polisialilado a ratas CD y se monitorizó la actividad de FVIII con el MDAA para el FVIII polisialilado en muestras de plasma de rata citradas tomadas antes y 0,08 horas, 0,5 horas, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas y 48 h después de la administración.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 7.

Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 7.

La figura 12 muestra el perfil farmacocinético obtenido. Los datos demostraron que el MDAA para el FVIII polisialilado era adecuado para determinar el perfil farmacocinético de FVIII polisialilado en un modelo animal que contenía FVIII endógeno. No hubo interferencia del FVIII de rata endógeno no modificado y el FVIII polisialilado pudo medirse con una sensibilidad muy alta.

Ejemplo 12

Exactitud y precisión de MDAA para FVIII polisialilado

Este ejemplo ilustra la exactitud y la precisión de un MDAA para FVIII polisialilado.

Para unir un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido, se incubaron 100 μl /pocillo de disolución de anticuerpo de recubrimiento que comprendía una dilución 1/1000 de anticuerpos NCAM anti-ácido polisialílico de ratón (clon 2-2B de MAB5324; Millipore, Inc.), NaHCO_3 0,1 M- Na_2CO_3 , pH 9,5 en los pocillos de una placa F96 Maxisorp a $0^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ durante la noche. Luego se lavaron las placas con tampón de lavado que comprendía PBS y Tween 20 al 0,05 %. Entonces se bloquearon los pocillos de la placa mediante incubación de 200 μl /pocillo de tampón de dilución que comprendía PBS y albúmina sérica humana 10 mg/ml a $37^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ durante 60 ± 10 minutos. Se lavaron entonces los pocillos bloqueados con tampón de lavado.

Para unir selectivamente una muestra a un soporte sólido, se añadieron 100 μl de las siguientes muestras a un pocillo 1) una serie de dilución de seis muestras que incluía un patrón de FVIII recombinante polisialilado preparado con disolución de plasma humano diluido 1/10 con PBS, leche desnatada al 3 % y benzamidina 50 mM y cubriendo un intervalo de concentración de FVIII de 1,1 mU/ml a 3 4,2 mU/ml (lo que representa factores de dilución de 1/6000 a 1/192 000); 2) una serie de dilución de plasma humano preparada usando una disolución de plasma humano 1/10 diluida con PBS, leche desnatada al 3 % y benzamidina 50 mM; o 3) una serie de dilución de un control de prueba preparado usando disolución de plasma humano 1/10 diluida con PBS, leche desnatada al 3 % y benzamidina 50 mM. Se preparó FVIII recombinante polisialilado uniendo un reactivo de ácido polisialílico de 20 kDa que contenía un grupo amino oxilo activo a N-glicanos oxidados de FVIII, véanse las publicaciones estadounidenses n.^{os} 20110027350 y 20110028693. La preparación tenía una actividad de FVIII:C de 3110 UI de FVIII/ml, medida con un método cromogénico, y contenía ácido N-acetilneuramínico 483 $\mu\text{g/ml}$ que dio como resultado un grado de polisialilación de aproximadamente 7-8. Se cargaron las muestras en la placa y se incubaron a de aproximadamente 18°C a aproximadamente 26°C durante 120 ± 10 minutos. En estas condiciones, el FVIII recombinante polisialilado se unió selectivamente al soporte sólido por medio de su resto de ácido polisialílico (PSA) usando un anticuerpo anti-PSA. Luego se lavó la placa 6 veces con tampón de lavado, seguido de incubación con 200 μl /pocillo de un tampón de dilución de FVIII que comprendía imidazol 3,4 g/l, NaCl 5,85 g/l; HSA 10 mg/ml, pH 7,4. Este equilibrio se realizó a de aproximadamente 18°C a aproximadamente 26°C durante 5-10 minutos.

Después de una etapa de lavado con tampón de lavado, se vaciaron los pocillos y se midió la actividad de FVIII con un ensayo cromogénico siguiendo el procedimiento cromogénico convencional usando el kit Immunochrom FVIII (Technoclone, GmbH, Viena, Austria). Se llenaron los pocillos con 20 μl de tampón de dilución de FVIII seguido de la adición secuencial de 20 μl de reactivo A y reactivo B. Se colocó la placa en un dispositivo de mezclado ajustado a

500 rpm y se incubó a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 15 minutos. Luego se añadieron 100 µl/pocillo de disolución de sustrato y se incubaron a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 45 minutos. Finalmente, se detuvo la reacción añadiendo 40 µl/pocillo de ácido acético al 20 %. Se miden las densidades ópticas (DO) en un lector ELISA a 405 nm (longitud de onda de referencia 620 nm). La evaluación cuantitativa se basa en una curva de calibración doble logarítmica. Las DO medias corregidas para el blanco de los patrones de curva de calibración individuales se correlacionarán con sus concentraciones de FVIII. La curva de calibración resultante se usa para calcular las concentraciones de FVIII de las muestras cuando sus DO están dentro del intervalo de DO cubierto por la curva de calibración. Tres analistas diferentes participaron en este estudio para verificar la influencia dependiente del operador.

La tabla 6 muestra las medias ($n = 112$) de los datos originales de las curvas de calibración y sus características. En particular, proporciona la media de DO corregidas para el blanco medidas para los seis patrones de curva de calibración D1 a D6, que tenían concentraciones de FVIII que oscilaban entre 34,2 y 1,1 mU/ml, y los blancos correspondientes. Además de estas lecturas de ensayo directas, se muestran las características de la curva de calibración, la pendiente, la ordenada en el origen y el coeficiente de correlación de las curvas de calibración resultantes. Finalmente, se proporciona el error total relativo (RTE), una medida combinada de exactitud y precisión del ajuste de la curva. Se calculó RTE ajustando las DO medidas para cada curva de calibración. Las concentraciones así obtenidas se multiplicaron por el factor de dilución y finalmente se promediaron para obtener la concentración media ajustada de manera inversa. RTE fue entonces la suma de la diferencia absoluta entre la concentración nominal y la concentración media ajustada de manera inversa del patrón de ensayo y la doble desviación estándar de la concentración media ajustada de manera inversa, expresada como un porcentaje de la concentración nominal ($RTE = (|x_n - \bar{x}_m| + 2 \times SD) / \bar{x}_m \times 100$; \bar{x}_n y \bar{x}_m representan la media nominal y la medida, respectivamente, y SD la desviación estándar de \bar{x}_m).

Tabla 6. Curva de calibración media de MDAA para FVIII recombinante polisialilado ($n = 112$)

Característica	D1	D2	D3	D4	D5	D6	Blanco	Pendiente	Ordenada	r	RTE
Media	1,348	0,758	0,400	0,203	0,097	0,049	0,127	0,9659	-1,329	0,9990	11,2
RSD	16,3	18,0	18,3	18,6	20,0	18,9	14,7	2,6	-6,7	n.a.	n.a.

n.a. significa no aplicable.

Las lecturas directas del MDAA, las DO corregidas para el blanco de los patrones de la curva de calibración, mostraron una variabilidad aceptable, que no fue mayor del 20 %, expresada como la RSD de la media de 112 curvas de calibración. Los RSD medidos para los patrones de curva de calibración individuales variaron solo ligeramente, oscilando entre el 16,3 % y el 20,0 %. También la RSD determinado para el blanco de ensayo (14,7 %) no difería obviamente de estos RSD. Estos datos apuntan a cambios leves en la temperatura ambiente como responsables de las alteraciones en las lecturas directas porque todo el procedimiento del ensayo se realiza a temperatura ambiente. Sin embargo, no se espera que estas leves alteraciones influyan negativamente en el rendimiento del ensayo tal como se muestra mediante los siguientes datos. Estos datos dieron como resultado curvas de calibración altamente similares: su pendiente y ordenada en el origen medias tenían RSD del 2,6 % y el 6,7 %, respectivamente, lo que ilustra el paralelismo de estas curvas construidas en diferentes días por diferentes operadores. Además, estas curvas fueron lineales, tal como se demuestra mediante sus coeficientes de correlación que oscilaron entre 0,9972 y 1,0000 con un coeficiente de correlación promedio de $r = 0,9990$. Dado que el coeficiente de correlación puede ser un indicador engañoso de la exactitud de la curva de calibración, también se calculó el RTE como una medida que describe de manera más adecuada el rendimiento de la curva de calibración. Por tanto, se determinó un RTE promedio del 11,2 % con valores individuales que oscilan entre el 2,4 % y el 19,7 %. Un examen más detenido mostró que solo 12 de los 112 RTE eran mayores del 15 %, mientras que 41 RTE eran menores del 10 %. Como prueba adicional de la calidad de ajuste y para confirmar el modelo de calibración seleccionado, también se calculó la concordancia de los patrones de curva de calibración de ensayo ajustada de manera inversa con sus concentraciones nominales. En la tabla 7 se muestran los resultados medios obtenidos y el intervalo.

Tabla 7. Concordancia de concentraciones ajustadas de manera inversa para las curvas de calibración de MDAA para FVIII recombinante polisialilado

Característica	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Media	93,4	102,8	105,9	104,6	97,2	96,9
RSD	2,1	2,0	2,1	2,8	3,2	3,1
Mín.	88,8	98,1	100,6	97,2	86,7	90,1
Máx.	99,4	107,8	111,8	112,5	104,2	106,1

Las concentraciones medias ajustadas de manera inversa de los patrones de calibración de ensayo concordaron bien con las concentraciones nominales respectivas. El patrón de ensayo D1 con la mayor concentración de FVIII recombinante polisialilado mostró la mayor desviación con respecto a la concentración nominal, mientras que el menor patrón de ensayo D6 difirió menos que los patrones de ensayo D3 y D4. Esto demostró que también pueden extrapolarse con exactitud muestras con bajas concentraciones de FVIII recombinante polisialilado. Sin embargo, todas las concentraciones individuales de ajuste de manera inversa se encontraban dentro de un intervalo, que cumple con las regulaciones actuales que requieren una concordancia de $\pm 20\%$ para al menos el 70 % de los patrones de calibración del ensayo después del ajuste de manera inversa. La figura 13 muestra la curva de calibración media obtenida para 24 ejecuciones. La inserción proporciona la concordancia de los patrones de calibración de ensayo ajustados de manera inversa como porcentaje de las concentraciones nominales respectivas.

En general, todos los datos confirmaron la exactitud, la precisión y la robustez de la construcción de las curvas de calibración para el MDAA para medir el FVIII polisialilado.

Ejemplo 13

Especificidad de MDAA para FVIII polisialilado

Este ejemplo ilustra la especificidad de un MDAA para FVIII polisialilado usando un ensayo de competencia.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 12.

Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 12, excepto en que 1) se diluyeron muestras de FVIII pegilado recombinante hasta una concentración de 68,4 mU/ml y luego se mezclaron 1+1 con ácido polisialílico de 20 kDa (Lipoxen, R.U.) para alcanzar concentraciones finales que oscilaron entre 0,06 $\mu\text{g/ml}$ y 1,000 $\mu\text{g/ml}$.

Se midió cada muestra de competencia dos veces en una ejecución. Las señales medias obtenidas se relacionaron luego con las obtenidas a partir de muestras que no contienen competidores con señales relativas calculadas. La figura 14 muestra la curva de competencia obtenida mediante este enfoque y además proporciona la CI_{50} , es decir, la concentración de ácido polisialílico que proporciona la mitad de la competencia máxima y el intervalo de confianza correspondiente $IC_{95\%}$, calculado para esta CI_{50} usando el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad. Los datos obtenidos confirmaron obviamente la especificidad de la etapa de captura porque se determinó una reducción claramente dependiente de la dosis de la señal medida en presencia de ácido polisialílico. Se alcanzó una competencia mitad de la máxima en las condiciones de ensayo dadas mediante una concentración de ácido polisialílico de 60,5 $\mu\text{g/ml}$.

Ejemplo 14

Precisión de MDAA para FVIII polisialilado

Este ejemplo ilustra la precisión de un MDAA para el FVIII polisialilado.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 12.

Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 12, excepto en que 1) se prepararon seis diluciones en serie 1+1 de FVIII pegilado recombinante a partir de la dilución de 1:5000.

Los resultados extrapolaron solo aquellas DO medias que estaban dentro del intervalo cubierto por la curva de calibración y usaron al menos tres diluciones con ese propósito. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se calculó la media para cinco diluciones individuales de la serie de dilución, lo que dio como resultado una RSD claramente menor del 15 %. Esto confirmó que la serie de dilución del control del ensayo era paralela a la del calibrador del ensayo y también cumplía con el requisito de medir varias muestras de control con concentraciones de analito altas, medias y bajas. Los resultados representan 39 ejecuciones realizadas por dos operadores, lo que da como resultado un total de 113 mediciones de FVIII recombinante polisialilado. Una concentración media de $180 \pm 11,2$ U/ml se tradujo en una RSD del 6,2 % que describe la precisión interejecución del ensayo. La precisión media interejecución, determinada para de dos a cuatro mediciones por ejecución, fue del 3,8 % con valores que oscilaron entre el 0,3 % y el 7,4 %. La figura 15 muestra estos datos y también proporciona la distribución de frecuencia de los datos.

La precisión del MDAA para el FVIII recombinante polisialilado fue excelente dado que este método combina los principios de un ensayo de unión a ligando con el de un ensayo de actividad. Por tanto, se requieren diluciones de muestra relativamente altas, es decir, series de dilución que comienzan con una dilución de 1/5000 para la captura selectiva. El siguiente ensayo de actividad cromogénica comprende varias etapas de transferencia de reactivos e incubación. Aunque la complejidad obvia del procedimiento general, la RSD, que describe la precisión interejecución, fue baja. La media de 39 ejecuciones tuvo una RSD del 6,2 %.

Ejemplo 15

Exactitud y precisión de MDAA para FVIII polisialilado en plasma

Este ejemplo ilustra la exactitud y la precisión de un MDAA para el FVIII polisialilado en plasma usando un ensayo de recuperación con adiciones conocidas.

Se unió un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido tal como se describe en el ejemplo 12.

Las muestras se unieron selectivamente a un soporte sólido y se midió la actividad de FVIII usando el ensayo cromogénico tal como se describe en el ejemplo 12, excepto en que las muestras comprendían plasma de ratones deficientes en FVIII (E17), de ratas y de macacos cangrejeros y se midieron antes y después de añadirse cantidades conocidas de FVIII recombinante polisialilado a cinco concentraciones que oscilan entre 0,05 U/ml y 15 U/ml.

Se determinaron la precisión intraejecución ($n = 6$; determinada por la concentración de FVIII recombinante polisialilado 0,05, 0,5 y 15 U/ml) y precisión interejecución ($n = 6$; determinada para 0,05, 0,25, 0,5, 1 y 15 U/ml) para muestras de plasma con adiciones conocidas, mientras que se determinó la precisión del ensayo calculando la recuperación de las cantidades conocidas añadidas. Finalmente, se calculó el error total como la suma de exactitud y precisión interejecución. La directriz actual de la EMA establece que este error total no debe superar el 30 % o el 40 % en el límite inferior de cuantificación del ensayo (LLOQ). La tabla 8 resume los datos de precisión, expresados como las RSD de las medias correspondientes, obtenidas para las muestras de tampón y plasma de animales con adiciones conocidas.

Nominal (U/ml)	Precisión interejecución ($n = 6$)				Precisión intraejecución ($n = 6$)			
	Rata	E17	Mono	Tampón	Rata	E17	Mono	Tampón
0,05	5,4	9,7	13,8	5,7	5,7	6,1	6,0	3,2
0,25	4,1	7,0	4,1	4,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0,5	5,3	6,7	3,8	2,7	6,3	3,5	2,8	3,0
1	5,5	5,4	2,8	3,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	3,9	4,9	2,9	4,5	3,4	1,0	3,2	2,7
Media	4,8	6,7	5,5	4,3	5,1	3,5	4,0	3,0
n.d. significa no realizado.								

Se hallaron RSD de menos del 10 % para todas menos una muestra. A esta muestra de plasma de mono en particular, para la que se determinó una RSD del 13,8 %, se añadieron cantidades conocidas de 0,05 U/ml, representando el límite inferior de cuantificación del ensayo. La media de las RSD, que describía la precisión inter e intraejecución en el intervalo investigado, fue en gran medida independiente de la concentración real y del plasma animal respectivo usado para las adiciones conocidas. Por tanto, el perfil de precisión calificó el MDAA para el FVIII recombinante polisialilado como un método bioanalítico muy preciso adecuado para la medición del FVIII recombinante polisialilado en muestras de plasma animal tal como se requiere, por ejemplo, para determinar los parámetros farmacocinéticos. La tabla 9 muestra las recuperaciones determinadas como una medida de la exactitud del ensayo y, finalmente, del error total, calculadas para las concentraciones de FVIII recombinante polisialilado individuales en el límite inferior de cuantificación de 0,05 U/ml y las concentraciones de FVIII recombinante polisialilado que oscilan entre 0,25 U/ml y 15 U/ml.

Nominal (U/ml)	Precisión (% de recuperación)			Nominal (U/ml)	Error total		
	Rata	E17	Mono		Rata	E17	Mono
0,05	98,3	98,0	99,0	0,05	7,1	11,7	14,8
0,25	95,3	96,0	101,3	0,25-15	8,9	11,0	5,8
0,5	95,0	97,0	100,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	97,4	93,2	99,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	96,2	96,6	98,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 9. Exactitud y error total del MDAA de FVIII recombinante polisialilado							
Nominal (U/ml)	Precisión (% de recuperación)			Nominal (U/ml)	Error total		
	Rata	E17	Mono		Rata	E17	Mono
Media	96,0	95,7	99,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
n.d. significa no realizado.							

La recuperación de FVIII recombinante polisialilado con adiciones conocidas fue excelente en todas las muestras de plasma animal sometidas a prueba en el presente documento, incluso a la menor concentración de 0,05 U/ml con adiciones conocidas. Además, el error total no fue mayor del 15 % en ninguno de los casos investigados. Estos datos, que cumplen fácilmente con la directriz de la EMA para la validación de ensayos bioanalíticos, califican claramente el MDAA para el FVIII recombinante polisialilado que se usará para la medición del FVIII recombinante polisialilado en el plasma de animales de laboratorio. La figura 16 muestra finalmente las curvas de dosis-respuesta para las tres muestras de plasma animal, diluidas 1/20 y con adiciones conocidas de FVIII recombinante polisialilado (0,068 U/ml). Esta dilución mínima de 1/20 que también determinó el límite inferior de cuantificación del ensayo se definió ya que estos datos demostraron que no se detectó una influencia sustancial.

La linealidad de las curvas de dosis-respuesta obtenidas en plasma animal diluido 1/20 fue tan buena como la determinada para las series de dilución respectivas del patrón de ensayo en tampón solamente. Además, las pendientes eran muy similares y diferían en menos del 2 % para la muestra de plasma de rata y E17 con adiciones conocidas y en menos de 9 % para la muestra de plasma de mono con adiciones conocidas.

Ejemplo 16

MDAA para FIX pegilado

Este ejemplo ilustra un MDAA para FIX pegilado.

Para unir un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido, se incubaron 100 µl/pocillo de disolución de anticuerpo de recubrimiento que comprendía anticuerpos anti-PEG de conejo 4 µg/ml (B47-2061-1; Epitomics, Inc., Burlingame, CA), NaHCO₃ 0,1 M-Na₂CO₃, pH 9,5 en los pocillos de una placa F96 Maxisorp a 0 °C ± 10 °C durante la noche. Luego se lavaron las placas con tampón de lavado que comprendía PBS y Tween 20 al 0,05 %. Entonces se bloquearon los pocillos de la placa mediante incubación de 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo que contenía PBS, leche desnatada al 3 % y benzamidina 50 mM a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 60 ± 10 minutos. Se lavaron entonces los pocillos bloqueados con tampón de lavado.

Para unir selectivamente una muestra a un soporte sólido, se añadieron 100 µl de las siguientes muestras a un pocillo 1) una serie de dilución de patrón de FIX recombinante pegilado preparado usando PBS que contenía HAS 10 mg/ml y cubría un intervalo de concentración de FIX de desde 45,5 mU/ml hasta 0,28 mU/ml 1 o 2) una serie de dilución de FIX recombinante no modificado preparado usando PBS que contenía HSA 10 mg/ml y cubría un intervalo de concentración de FIX de desde 350 mU/ml hasta 25 000 MU/ml. Se utilizó FIX recombinante pegilado con un grado de pegilación de aproximadamente 1. Se cargaron las muestras en la placa y se incubaron a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 60 ± 10 minutos. En estas condiciones, el FIX recombinante pegilado se unió selectivamente al soporte sólido por medio de su resto PEG usando un anticuerpo anti-PEG. Luego, se lavó la placa 6 veces con tampón de lavado y luego se incubó con 200 µl/pocillo de un tampón de dilución de FIX que comprendía imidazol 3,4 g/l, NaCl 5,85 g/l; HSA 10 mg/ml, pH 7,4. Este equilibrio se realizó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Después de una etapa de lavado con tampón de lavado, se vaciaron los pocillos y se midió la actividad de FIX con un ensayo cromogénico de FIX siguiendo las instrucciones del fabricante (HYPHEN Biomed, Viena, Austria).

La figura 17 muestra los datos obtenidos para el FIX pegilado y el FIX no modificado. El FIX pegilado demostró una señal clara dependiente de la concentración con una relación lineal de señal con concentración en el intervalo de 5,7 a 0,28 mU de FIX/ml. En contraste, el FIX no pegilado no mostró ninguna señal sustancial, ni siquiera a concentraciones 1000 veces mayores.

Ejemplo 17

Formato de ensayo de coagulación de MDAA para FVIII pegilado

Este ejemplo ilustra que también puede realizarse un MDAA para FVIII recombinante pegilado en el formato de un ensayo de coagulación.

Para unir un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido, se incubaron MaxiSorp Startubes

(Nunc) con 0,5 ml de una disolución de anticuerpo de recubrimiento que comprendía PBS y 20 µg/ml de anticuerpo anti-PEG de conejo purificado por afinidad (n.º A151) a 0 °C ± 10 °C durante 18 horas. A continuación, se lavaron los tubos con tampón de lavado que comprendía PBS y Tween 20 al 0,05 %. Entonces se bloquearon los pocillos de la placa mediante incubación de 1 ml de tampón de bloqueo que contenía PBS, leche desnatada al 3 % y benzamidina 50 mM a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 60 ± 10 minutos. Se lavaron entonces los pocillos bloqueados con tampón de lavado.

Para unir selectivamente una muestra a un soporte sólido, 0,5 ml de 1) una serie de dilución de cinco muestras que incluía un patrón de FVIII recombinante pegilado que cubre un intervalo de concentración de FVIII de 0,04 mU/ml a 4 mU/ml; y 2) una serie de cinco muestras de dilución que incluían un patrón de FVIII recombinante Advate que cubre un intervalo de concentración de FVIII de 0,04 mU/ml a 4 mU/ml. El tampón de dilución sirvió como blanco. Se cargaron las muestras en el tubo y se incubaron a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 60 ± 10 minutos. Luego se lavó la placa 6 veces con tampón de lavado, seguido de incubación con 0,5 ml de un tampón de dilución de FVIII que comprendía imidazol 3,4 g/l, NaCl 5,85 g/l; HSA 10 mg/ml, pH 7,4. Este equilibrio se realizó a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 5-10 minutos. Luego se vaciaron los tubos y se realizó un ensayo de coagulación mediante la adición de 200 µl de tampón de dilución de FVIII y 100 µl de plasma con deficiencia en FVIII (n.º 481C00D, Technoclone, GmbH, Viena, Austria). Se incubó la mezcla a 37 °C ± 5 °C durante 3 minutos antes de añadir 100 µl de CaCl₂ 25 mM para iniciar la coagulación. Los tubos se mantuvieron en un baño de agua a 37 °C ± 5 °C y se verificaron visualmente para detectar la formación de coágulos.

La figura 18 muestra los resultados obtenidos. Se produjo coagulación solo en los tubos que contenían FVIII recombinante pegilado, mientras que los tubos que contenían FVIII recombinante Advate no mostraron signos de formación de coágulos en 80 minutos. Además, hubo una relación entre el tiempo de coagulación y la concentración de FVIII recombinante pegilado. Estos datos demuestran que puede usarse una técnica distinta de la medición de la actividad cromogénica para un MDAA.

Ejemplo 18

Formato de ensayo de coagulación de MDAA para FVIII polisialilado

Este ejemplo ilustra que también puede realizarse un MDAA para el FVIII recombinante polisialilado en el formato de un ensayo de coagulación.

Para unir un anticuerpo de reconocimiento de modificación a un soporte sólido, se incubaron MaxiSorp Startubes (Nunc) con 0,5 ml de una disolución de anticuerpo de recubrimiento que comprendía PBS y 20 µg/ml de anticuerpo NCAM anti-PSA de ratón (MAB5324) a 0 °C ± 10 °C Durante 18 horas. A continuación, se lavaron los tubos con tampón de lavado que comprendía PBS y Tween 20 al 0,05 %. Entonces se bloquearon los pocillos de la placa mediante incubación de 1 ml de tampón de bloqueo que contenía PBS, leche desnatada al 3 % y benzamidina 50 mM a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 60 ± 10 minutos. Se lavaron entonces los pocillos bloqueados con tampón de lavado.

Para unir selectivamente una muestra a un soporte sólido, 0,5 ml de 1) una serie de dilución de cinco muestras que incluía un patrón de FVIII recombinante polisialilado que cubre un intervalo de concentración de FVIII de 0,04 mU/ml a 4 mU/ml; y 2) una serie de cinco muestras de dilución que incluía un patrón de FVIII recombinante Advate que cubre un intervalo de concentración de FVIII de 0,04 mU/ml a 4 mU/ml. El tampón de dilución sirvió como blanco. Se cargaron las muestras en el tubo y se incubaron a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 60 ± 10 minutos. Luego, se lavó la placa 6 veces con tampón de lavado, seguido de incubación con 0,5 ml de tampón de dilución de FVIII que comprendía imidazol 3,4 g/l, NaCl 5,85 g/l; HSA 10 mg/ml, pH 7,4. Este equilibrio se realizó a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 26 °C durante 5-10 minutos. Luego se vaciaron los tubos y se realizó un ensayo de coagulación mediante la adición de 200 µl de tampón de dilución de FVIII y 100 µl de plasma con deficiencia en FVIII (n.º 481C00D, Technoclone, GmbH, Viena, Austria). Se incubó la mezcla a 37 °C ± 5 °C durante 3 minutos antes de añadir 100 µl de CaCl₂ 25 mM para iniciar la coagulación. Los tubos se mantuvieron en un baño de agua a 37 °C ± 5 °C y se verificaron visualmente para detectar la formación de coágulos.

La figura 19 muestra los resultados obtenidos. Se produjo coagulación solo en los tubos que contenían FVIII recombinante polisialilado, mientras que los tubos que contenían Advate no mostraron signos de formación de coágulos en un plazo de 80 minutos. Además, hubo una relación entre el tiempo de coagulación y la concentración de rFVIII polisialilado. Estos datos demuestran que también puede usarse una técnica distinta de la medición de la actividad cromogénica para el MDAA.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan una característica, artículo, cantidad, parámetro, propiedad, término, etcétera, usados en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa que la característica, artículo, cantidad, parámetro, propiedad o término así calificado abarca un intervalo de más o menos el diez por ciento por encima y por debajo del valor de la

característica, artículo, cantidad, parámetro, propiedad o término establecido. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada indicación numérica debe interpretarse al menos a la luz del número de cifras significativas notificadas y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales. A pesar de que los valores y los intervalos numéricos que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores e intervalos numéricos establecidos en los ejemplos específicos se notifican con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor o intervalo numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar hallada en sus respectivas mediciones de prueba. La mención de intervalos numéricos de los valores en el presente documento tiene la intención de servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor numérico independiente que se encuentre dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual de un intervalo numérico se incorpora a la presente memoria descriptiva como si se hubiera mencionado individualmente en el presente documento.

Los términos “un(o)”, “una”, “el” y referentes similares usados en el contexto de la descripción de la presente invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse de modo que cubran tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o lo contradiga de otro modo claramente el contexto. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o lo contradiga claramente el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento pretende simplemente iluminar mejor la presente invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otro modo. Ningún lenguaje en la presente memoria descriptiva debe interpretarse como un indicador de ningún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Las realizaciones específicas divulgadas en el presente documento pueden estar limitadas adicionalmente en las reivindicaciones usando el lenguaje que consiste o que consiste esencialmente. Cuando se usa en las reivindicaciones, ya sea tal como se presenta o añadido por enmienda, el término de transición “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o componente no especificado en las reivindicaciones. El término de transición “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a las etapas o los materiales especificados y aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s). Las realizaciones de la presente invención así reivindicadas se describen inherente o expresamente y se habilitan en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la presencia de un polipéptido recombinante que comprende una modificación, comprendiendo el método las etapas de:
- 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
- incubar una muestra que incluye el polipéptido recombinante que comprende la modificación con un agente de captura que se une selectivamente a la modificación en condiciones que permiten la unión selectiva del agente de captura a la modificación, formándose así un complejo polipéptido-agente, en el que la modificación asociada con el polipéptido recombinante se selecciona de al menos una de pegilación, hesilación, almidonación o polisialilación y en el que el agente de captura es un anticuerpo de reconocimiento de modificación;
- purificar el complejo polipéptido-agente de la muestra; y
- someter a ensayo para detectar la presencia del polipéptido recombinante y/o una actividad de polipéptido, en el que la detección del polipéptido recombinante y/o la actividad de polipéptido es indicativa de la presencia del polipéptido recombinante que comprende la modificación.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra incluye un polipéptido sin la modificación y/o un polipéptido con un patrón o grado de modificación diferente; opcionalmente
- en el que el polipéptido recombinante es un factor de crecimiento, una citocina, un agente inmunomodulador, una hormona, un anticuerpo, una enzima, un inhibidor enzimático, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una esterasa, una transferasa, una oxidoreductasa, una hidrolasa, una asparaginasa, una adenosina desaminasa, una neurotoxina, una proteína hepática, una proteína pancreática, una proteína muscular, una proteína cerebral, una proteína pulmonar o una proteína sanguínea;
- opcionalmente, en el que la esterasa es una butirilcolinesterasa o una acetilcolinesterasa;
- opcionalmente, en el que la citocina es una quimiocina, una linfocina, un factor de necrosis tumoral, un factor hematopoyético;
- opcionalmente, en el que el agente inmunomodulador es una interleucina o un interferón;
- opcionalmente, en el que la proteína sanguínea es un agente estimulante de la eritropoyesis, una proteasa, un inhibidor de proteasa o un factor de coagulación; opcionalmente, en el que el agente estimulante de la eritropoyesis es una eritropoyetina o una darbepoetina; opcionalmente, en el que la proteasa es tripsina, quimotripsina, elastasa, pepsina o ADAMTS13; opcionalmente, en el que el inhibidor de proteasa es α 1-antitripsina, α 1-antiquimotripsina, inhibidor de C1 o α 2-antiplasmina, antitrombina;
- opcionalmente, en el que el factor de coagulación es un factor II, un factor IIa, un factor VII, un factor VIIa, un factor VIII, un factor VIIIa, un factor IX, un factor IXa, un factor X o un factor Xa;
- opcionalmente en el que la proteína sanguínea es ADAMTS-13, α 1-antiplasmina, α 2-antiplasmina, antitrombina, antitrombina III, procoagulante del cáncer, eritropoyetina, factor II, factor IIa, factor V, factor Va, factor VI, factor VIa, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, fibronectina, fibrinógeno (factor I), cofactor II de heparina, cininógeno de alto peso molecular (HMWK), inmunoglobulina intramuscular, inmunoglobulina intravenosa, plasmina, plasminógeno, inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI1), inhibidor 2 del activador del plasminógeno (PAI2), precalicreína, prostaciclina, proteína C, proteína C activa (APC), proteína S, proteína Z, inhibidor de proteasa relacionada con la proteína Z, trombomodulina, factor tisular (factor III), inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), activador del plasminógeno tisular (t-PA), urocinasa y factor de Von Willebrand.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la muestra incluye una preparación purificada del polipéptido recombinante, una preparación parcialmente purificada del polipéptido recombinante, una preparación no purificada del polipéptido recombinante, un extracto en bruto del polipéptido recombinante, un extracto fraccionado del polipéptido recombinante, un lisado celular que incluye el polipéptido recombinante, o una muestra biológica;
- opcionalmente, en el que la muestra biológica comprende células, una muestra de tejido, una muestra de sangre, una muestra de líquido corporal o una muestra de órgano tomada directamente de un individuo;
- opcionalmente, en el que el líquido corporal es orina, esputo, semen, heces, saliva, bilis, líquido cerebral,

frotis nasal, frotis genitourinario, aspirado nasal o líquido cefalorraquídeo;

opcionalmente, en el que la muestra biológica es una preparación derivada de una muestra tomada directamente de un individuo; opcionalmente, en el que la preparación derivada de la muestra tomada directamente del individuo es una fracción plasmática de una muestra de sangre, una fracción de suero de una muestra de sangre o un eluido de un proceso de purificación.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la muestra se trata para mejorar la detectabilidad del polipéptido recombinante o mejorar la actividad del polipéptido recombinante; opcionalmente, en el que el tratamiento comprende lisis, dilución, purificación, extracción, filtración, destilación, separación, concentración, inactivación de componentes interferentes, la adición de reactivos, o cualquier combinación de los mismos.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el agente de captura tiene una constante de velocidad de asociación para un polipéptido que comprende la modificación de más de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o más de $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; opcionalmente, en el que el agente de captura tiene una constante de velocidad de disociación para un polipéptido que comprende la modificación de menos de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; opcionalmente, en el que el agente de captura tiene una constante de disociación de equilibrio para un polipéptido que comprende la modificación de menos de 0,500 nM, menos de 0,450 nM, menos de 0,400 nM, menos de 0,350 nM, menos de 0,300 nM, menos de 0,250 nM, menos de 0,200 nM, menos de 0,150 nM, menos de 0,100 nM o menos de 0,050 nM; opcionalmente, en el que el agente de captura tiene una constante de velocidad de asociación para un polipéptido sin una modificación o un polipéptido con un patrón o grado de modificación diferente de menos de $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o menos de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; opcionalmente, en el que el agente de captura tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para el polipéptido recombinante que comprende una modificación que es de más de $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o más de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ con respecto a la constante de velocidad de asociación (K_a) del agente de captura para un polipéptido recombinante sin tal modificación y/o la constante de velocidad de asociación (K_a) del agente de captura para un polipéptido recombinante con un patrón o grado de modificación diferente; opcionalmente, en el que el agente de captura tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para el polipéptido recombinante que comprende una modificación que es al menos 2 veces más, al menos 3 veces más, al menos 4 veces más, al menos 5 veces más, al menos 6 veces más, al menos 7 veces más, al menos 8 veces más, al menos 9 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, al menos 1000 veces más o al menos al menos 10 000 veces más que la constante de velocidad de asociación (K_a) del agente de captura para un polipéptido recombinante sin tal modificación y/o que la constante de velocidad de asociación (K_a) del agente de captura para un polipéptido recombinante con un patrón o grado de modificación diferente; opcionalmente, en el que el agente de captura tiene una razón de especificidad de unión para un polipéptido recombinante que comprende una modificación con respecto a un polipéptido recombinante sin tal modificación y/o con relación a un polipéptido recombinante con un patrón o grado de modificación diferente de al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1 o al menos 40:1; opcionalmente, en el que el agente de captura es un agente de captura multivalente.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente de captura distingue el polipéptido recombinante que comprende una modificación del mismo polipéptido pero sin la modificación; opcionalmente, en el que el agente de captura distingue el polipéptido recombinante que comprende una modificación del mismo polipéptido pero con un patrón o grado diferente de la misma modificación.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo de reconocimiento de modificación es un anticuerpo anti-hidrato de carbono, un anticuerpo anti-acetilo, un anticuerpo anti-alquilo, un anticuerpo anti-metilo, un anticuerpo anti-amida, un anticuerpo anti-carboxilo, un anticuerpo anti-glicosilo, un anticuerpo anti-ácido polisialílico, un anticuerpo anti-hidroxilo, un anticuerpo anti-polisacárido, un anticuerpo anti-almidón, un anticuerpo anti-hidroxil-etil-almidón (HES), un anticuerpo anti-azúcar o un anticuerpo anti-polietilenglicol (PEG).

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polipéptido recombinante que comprende la modificación o el factor de coagulación recombinante que comprende la modificación es un factor II pegilado, un factor IIa pegilado, un factor II polisialilado, un factor IIa polisialilado, un factor II hesilado, un factor IIa hesilado, un factor II almidonado o un factor IIa almidonado;

o en el que el polipéptido recombinante que comprende la modificación o el factor de coagulación recombinante que comprende la modificación es un factor VII pegilado, un factor VIIa pegilado, un factor VII polisialilado, un factor VIIa polisialilado, un factor VII hesilado, un factor VIIa hesilado, un factor VII almidonado o un factor VIIa almidonado;

o en el que el polipéptido recombinante que comprende la modificación o el factor de coagulación recombinante que comprende la modificación es un factor VIII pegilado, un factor VIIIa pegilado, un factor VIII polisialilado, un factor VIIIa polisialilado, un factor VIII hesilado, un factor VIIIa hesilado, un factor VIII almidonado o un factor VIIIa almidonado;

o en el que el polipéptido recombinante que comprende la modificación o el factor de coagulación recombinante que comprende la modificación es un factor IX pegilado, un factor IXa pegilado, un factor IX polisialilado, un factor IXa polisialilado, un factor IX hesilado, un factor IXa hesilado, un factor IX almidonado o un factor IXa almidonado.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el agente de captura está unido a un soporte sólido; opcionalmente, en el que el soporte sólido es una placa de múltiples pocillos, una película, un tubo, una lámina, una columna o una micropartícula.

10. Método para detectar la presencia de:

(i) un factor VII recombinante pegilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VII recombinante pegilado con un anticuerpo anti-PEG en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PEG al factor VII recombinante pegilado, formándose así un complejo factor VII-anticuerpo; purificar el complejo factor VII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VII recombinante y/o una actividad de factor VII, en el que la detección del factor VII y/o la actividad de factor VII es indicativa de la presencia del factor VII recombinante pegilado, en el que el factor VII recombinante pegilado es un factor VII y/o un factor VIIa;

(ii) un factor VII recombinante polisialilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VII recombinante polisialilado con un anticuerpo anti-PSA en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PSA al factor VII recombinante polisialilado, formándose así un complejo factor VII-anticuerpo; purificar el complejo factor VII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VII recombinante y/o una actividad de factor VII, en el que la detección del factor VII y/o la actividad de factor VII es indicativa de la presencia del factor VII recombinante polisialilado, en el que el factor VII recombinante polisialilado es un factor VII y/o un factor VIIa;

(iii) de un factor VII recombinante hesilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VII recombinante hesilado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor VII recombinante hesilado, formándose así un complejo factor VII-anticuerpo; purificar el complejo factor VII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VII recombinante y/o una actividad de factor VII, en el que la detección del factor VII y/o la actividad de factor VII es indicativa de la presencia del factor VII recombinante hesilado, en el que el factor VII recombinante hesilado es un factor VII y/o un factor VIIa;

(iv) de un factor VII recombinante almidonado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VII recombinante almidonado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor VII recombinante almidonado, formándose así un complejo factor VII-anticuerpo; purificar el complejo factor VII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VII recombinante y/o una actividad de factor VII, en el que la detección del factor VII y/o la actividad de factor VII es indicativa de la presencia del factor VII recombinante almidonado, en el que el factor VII recombinante almidonado es un factor VII y/o un factor VIIa;

(v) un factor VIII recombinante pegilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VIII recombinante pegilado con un anticuerpo anti-PEG en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PEG al factor VIII recombinante pegilado, formándose así un complejo factor VIII-anticuerpo; purificar el complejo factor VIII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VIII recombinante y/o una actividad de factor VIII, en el que la detección del factor VIII y/o la actividad de factor VIII es indicativa de la presencia del factor VIII recombinante pegilado, en el que el factor VIII recombinante pegilado es un factor VIII y/o un factor VIIIa;

(vi) un factor VIII recombinante polisialilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VIII recombinante polisialilado con un anticuerpo anti-PSA en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PSA al factor VIII recombinante polisialilado, formándose así un complejo factor VIII-anticuerpo; purificar el complejo factor VIII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VIII recombinante y/o una actividad de factor VIII, en el que la detección del factor VIII y/o la actividad de factor VIII es indicativa de la presencia del factor VIII recombinante polisialilado, en el que el factor VIII recombinante polisialilado es un factor VIII y/o un factor VIIIa;

(vii) un factor VIII recombinante hesilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VIII recombinante hesilado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor VIII recombinante hesilado, formándose así un complejo factor VIII-anticuerpo; purificar el complejo factor VIII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VIII recombinante y/o una actividad de factor VIII, en el que la detección del factor VIII y/o la actividad de factor VIII es indicativa de la presencia del factor VIII recombinante hesilado, en el que el factor VIII recombinante hesilado es un factor VII y/o un factor VIIIa;

(viii) un factor VIII recombinante almidonado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor VIII recombinante almidonado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor VIII recombinante almidonado, formándose así un complejo factor VIII-anticuerpo; purificar el complejo factor VIII-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor VIII recombinante y/o una actividad de factor VIII, en el que la detección del factor VIII y/o la actividad de factor VIII es indicativa de la presencia del factor VIII recombinante almidonado, en el que el factor VIII recombinante almidonado es un factor VIII y/o un factor VIIIa;

(ix) un factor IX recombinante pegilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor IX recombinante pegilado con un anticuerpo anti-PEG en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PEG al factor IX recombinante pegilado, formándose así un complejo factor IX-anticuerpo; purificar el complejo factor IX-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor IX recombinante y/o una actividad de factor IX, en el que la detección del factor IX y/o la actividad de factor IX es indicativa de la presencia del factor IX recombinante pegilado, en el que el factor IX recombinante pegilado es un factor IX y/o un factor IXa;

(x) un factor IX recombinante polisialilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor IX recombinante polisialilado con un anticuerpo anti-PSA en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-PSA al factor IX recombinante polisialilado, formándose así un complejo factor IX-anticuerpo; purificar el complejo factor IX-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor IX recombinante y/o una actividad de factor IX, en el que la detección del factor IX y/o la actividad de factor IX es indicativa de la presencia del factor IX recombinante polisialilado, en el que el factor IX recombinante polisialilado es un factor IX y/o un factor IXa;

(xi) un factor IX recombinante hesilado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor IX recombinante hesilado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor IX recombinante hesilado, formándose así un complejo factor IX-anticuerpo; purificar el complejo factor IX-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor IX recombinante y/o una actividad de factor IX, en el que la detección del factor IX y/o la actividad de factor IX es indicativa de la presencia del factor IX recombinante hesilado, en el que el factor IX recombinante hesilado es un factor IX y/o un factor IXa;

(xii) un factor IX recombinante almidonado, comprendiendo el método las etapas de: incubar una muestra que incluye el factor IX recombinante almidonado con un anticuerpo anti-S en condiciones que permiten la unión selectiva del anticuerpo anti-S al factor IX recombinante almidonado, formándose así un complejo factor IX-anticuerpo; purificar el complejo factor IX-anticuerpo de la muestra; y someter a ensayo para detectar la presencia del factor IX recombinante y/o una actividad de factor IX, en el que la detección del factor IX y/o la actividad de factor IX es indicativa de la presencia del factor IX recombinante almidonado, en el que el factor IX recombinante almidonado es un factor IX y/o un factor IXa.

11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la etapa de someter a ensayo se realiza usando un ensayo cualitativo o un ensayo cuantitativo, opcionalmente en el que la etapa de someter a ensayo se realiza usando un ensayo *in vitro*, un ensayo basado en células o un ensayo *in vivo*.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la etapa de someter a ensayo se realiza usando un ensayo de polipéptido no específico o un ensayo de polipéptido específico; opcionalmente, en el que el ensayo de polipéptido no específico es un ensayo de absorción de UV, un ensayo de Biuret o un ensayo de Bradford;

opcionalmente, en el que el ensayo de polipéptido específico es un ensayo cromogénico, un ensayo colorimétrico, un ensayo cronométrico, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de electroquimioluminiscencia, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo fluorogénico, un ensayo de transferencia de energía por resonancia, un ensayo de polarización plana, un ensayo de citometría de flujo, un ensayo de base inmunológica o un ensayo de actividad; opcionalmente, en el que el ensayo de actividad es un ensayo de actividad enzimática, un ensayo de actividad inhibitoria, un ensayo de actividad de coagulación o un ensayo de actividad de polimerización.

13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la unión selectiva del agente de

captura se produce a un pH neutro a alcalino.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el polipéptido recombinante es un polipéptido terapéutico; opcionalmente en el que el polipéptido terapéutico es factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), trombina (FN), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF), proteasa ADAMTS 13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón α (IFN- α), interferón de consenso, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoyetina (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, polipéptido similar a angiopoyetina 1 (ANGPTL1), polipéptido similar a angiopoyetina 2 (ANGPTL2), polipéptido similar a angiopoyetina 3 (ANGPTL3), polipéptido similar a angiopoyetina 4 (ANGPTL4), polipéptido similar a angiopoyetina 5 (ANGPTL5), polipéptido similar a angiopoyetina 6 (ANGPTL6), polipéptido similar a angiopoyetina 7 (ANGPTL7), vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína morfogénica ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea 8, proteína morfogénica ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica ósea 15, receptor IA de proteína morfogénica ósea, receptor IB de proteína morfogénica ósea, receptor II de proteína morfogénica ósea, factor neurotrófico derivado del cerebro, cardiotrofina 1, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, cripto, criptico, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 1, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 α , factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 β , factor de crecimiento de células endoteliales β , endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, epigen, epirregulina, agente atrayente de neutrófilos derivado del epitelio, factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de crecimiento de fibroblastos 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8, factor de crecimiento de fibroblastos 8b, factor de crecimiento de fibroblastos 8c, factor de crecimiento de fibroblastos 9, factor de crecimiento de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos 11, factor de crecimiento de fibroblastos 12, factor de crecimiento de fibroblastos 13, factor de crecimiento de fibroblastos 16, factor de crecimiento de fibroblastos 17, factor de crecimiento de fibroblastos 19, factor de crecimiento de fibroblastos 20, factor de crecimiento de fibroblastos 21, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor α 1 de factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, receptor α 2 de factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, proteína relacionada con el crecimiento, proteína relacionada con el crecimiento α , proteína relacionada con el crecimiento β , proteína relacionada con el crecimiento γ , factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor de crecimiento similar a insulina I, factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento similar a insulina II, proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor α del factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor del factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina 3, neurotrofina 4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento placentario 2, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, factor de crecimiento derivado de plaquetas AB, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, receptor α de factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor β de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor del factor de células madre, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento transformante β 1, factor de crecimiento transformante β 1.2, factor de crecimiento transformante β 2, factor de crecimiento transformante β 3, factor de crecimiento transformante β 5, factor de crecimiento transformante latente β 1, proteína I de unión a factor de crecimiento transformante β , proteína II de unión a factor de crecimiento transformante β , proteína III de unión a factor de crecimiento transformante β , linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor tipo I del factor de necrosis tumoral, receptor tipo II del factor de necrosis tumoral, receptor del activador del plasminógeno de tipo urocinasa, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, lectina, ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del folículo, hormona estimulante de la tiroides, activador del plasminógeno tisular, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuína, hormona leutinizante, estrógeno, insulina, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombopoyetina, urocinasa, integrina, trombina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo del mismo.
15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la modificación se selecciona de al menos una de hesilación, almidonación o polisialilación.
16. Uso de un kit para poner en práctica un método para detectar la presencia de un polipéptido recombinante

que comprende una modificación según:

(i) una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, comprendiendo el kit;

5 (a) uno o más agentes de captura que se unen selectivamente a la modificación en condiciones que permiten la unión selectiva del agente de captura a la modificación, en el que la modificación asociada con el polipéptido recombinante se selecciona de al menos una de pegilación, hesilación, almidonación o polisialilación y en el que el agente de captura es un anticuerpo de reconocimiento de modificación; y

10 (b) uno o más reactivos necesarios para detectar la presencia y/o una actividad de un polipéptido recombinante; o

(ii) la reivindicación 15, comprendiendo el kit:

15 (a') uno o más agentes de captura que se unen selectivamente a la modificación en condiciones que permiten la unión selectiva del agente de captura a la modificación, en el que la modificación asociada con el polipéptido recombinante se selecciona de al menos una de hesilación, almidonación o polisialilación y en el que el agente de captura es un anticuerpo de reconocimiento de modificación; y

20 (b') uno o más reactivos necesarios para detectar la presencia y/o una actividad de un polipéptido recombinante.

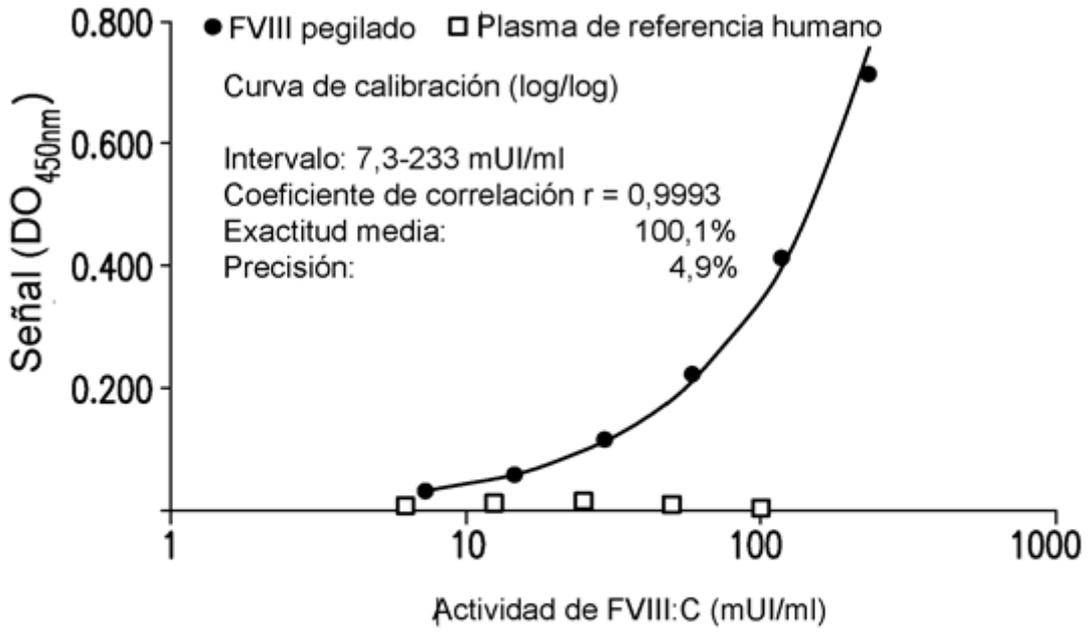


FIG. 1

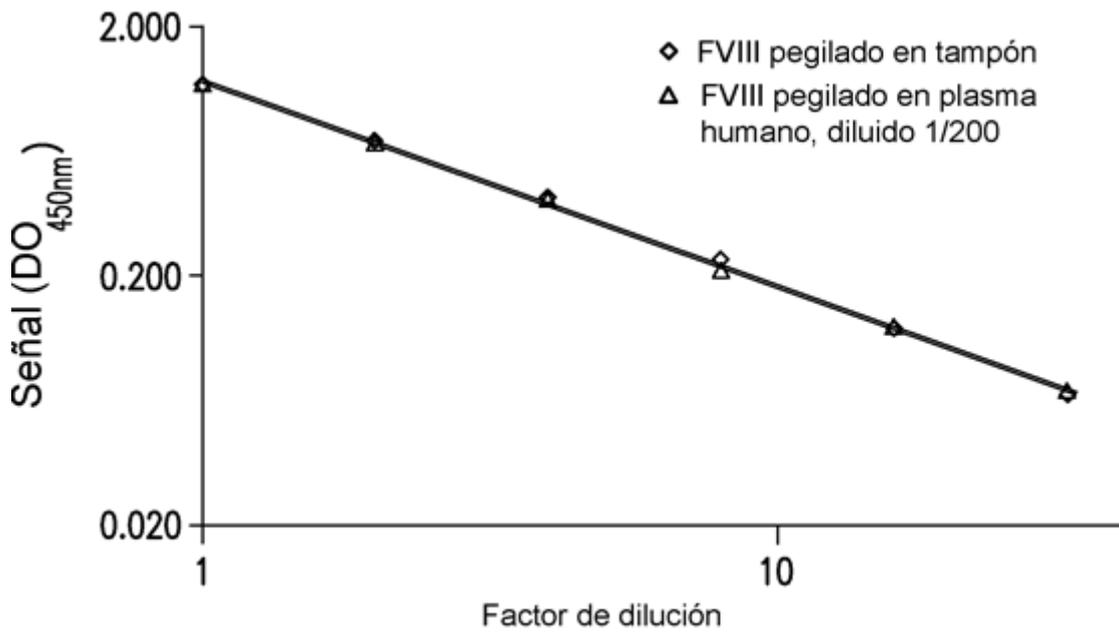


FIG. 2

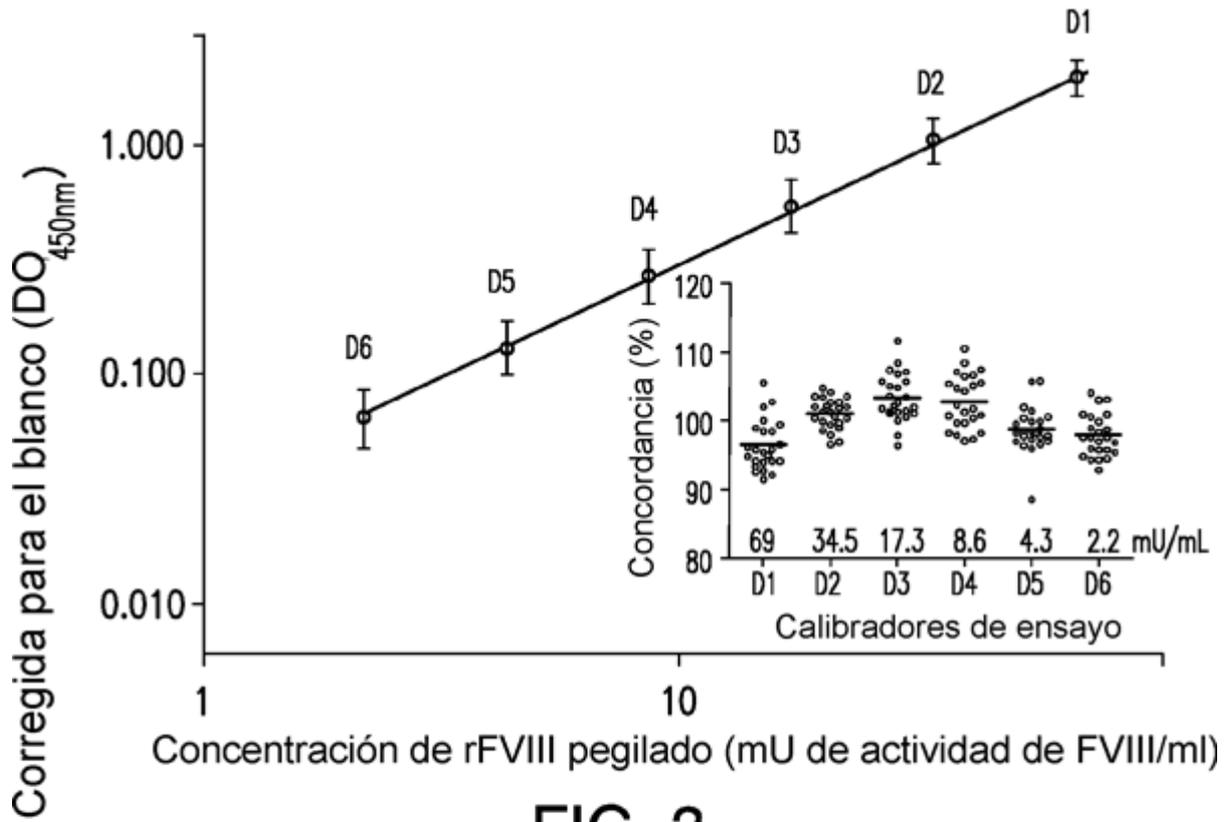


FIG. 3

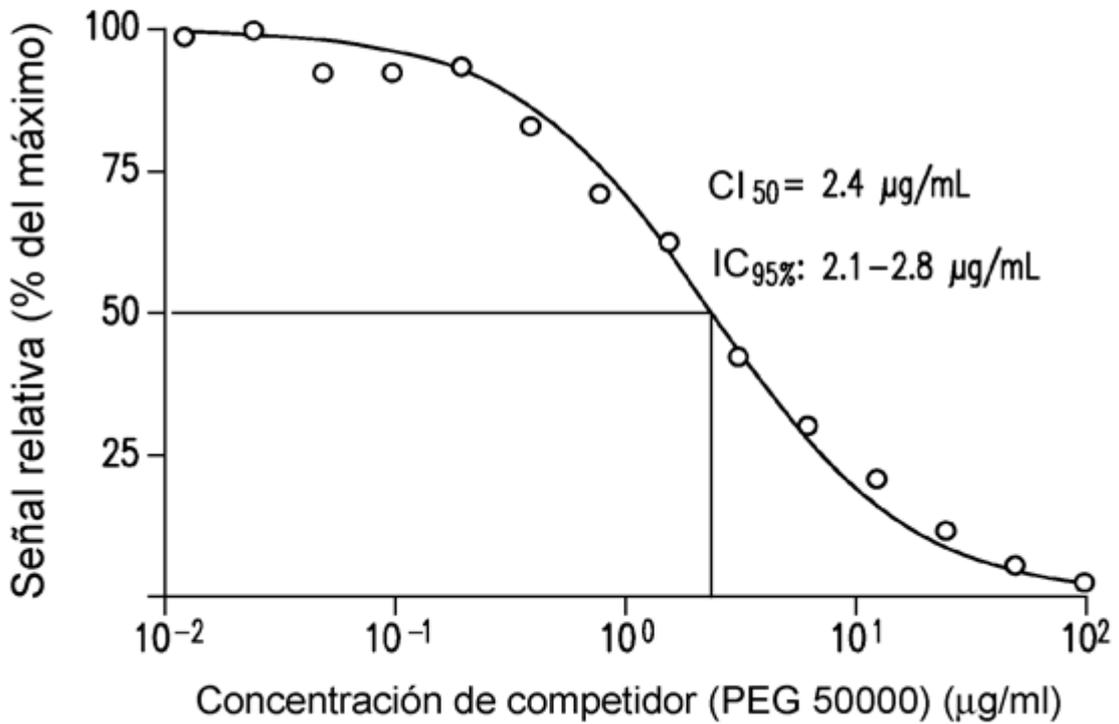


FIG. 4

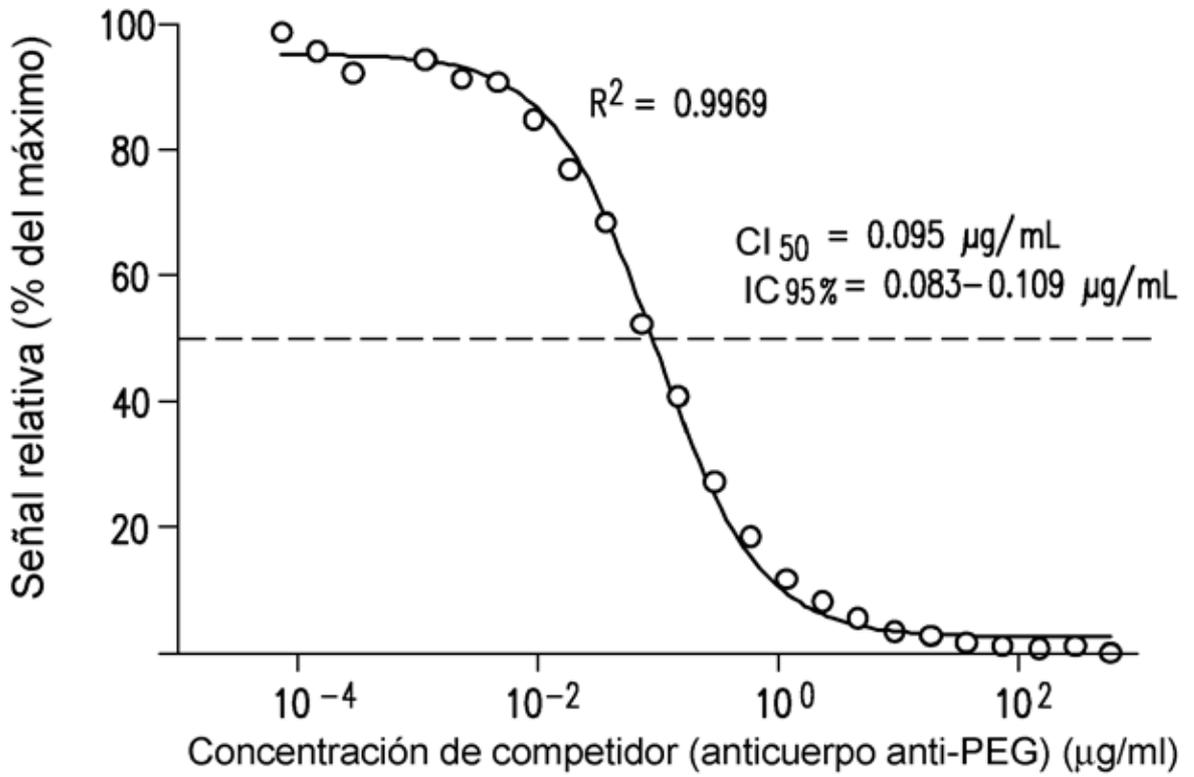


FIG. 5

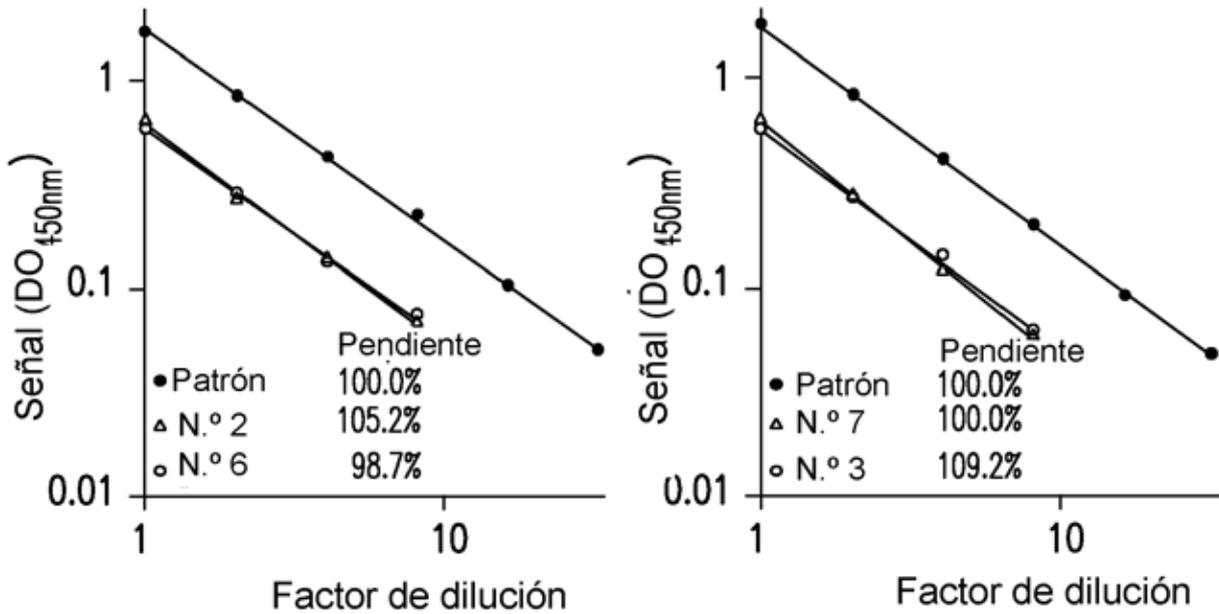


FIG. 6

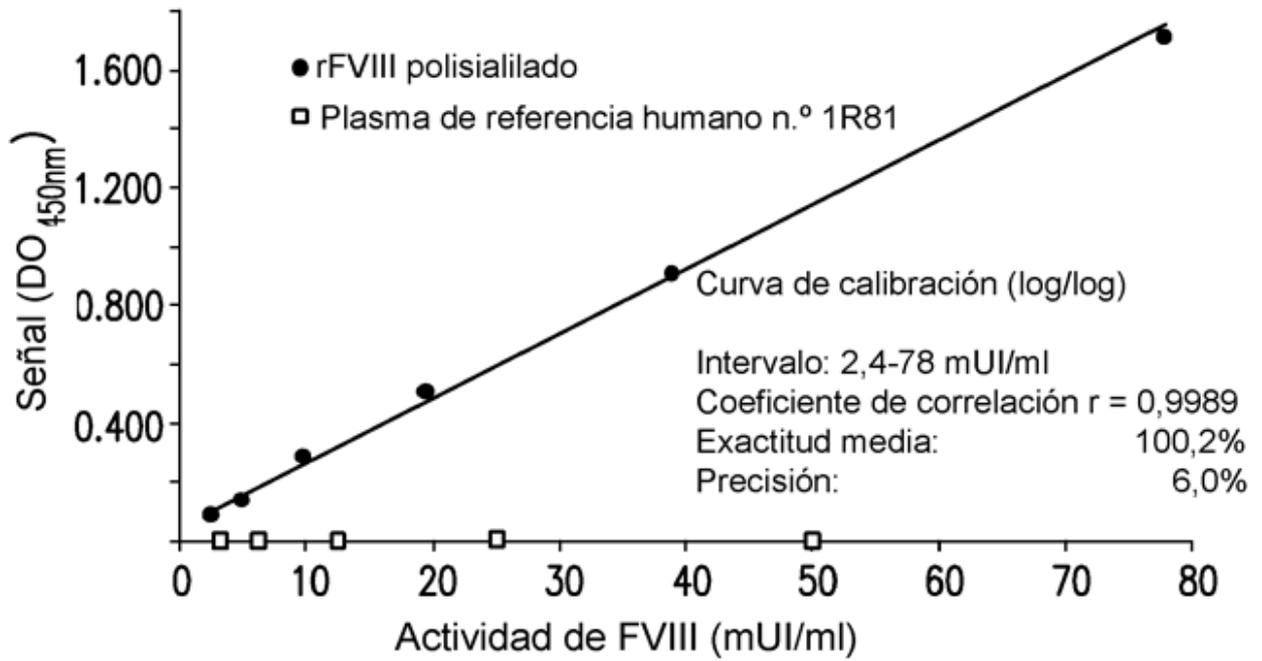


FIG. 7

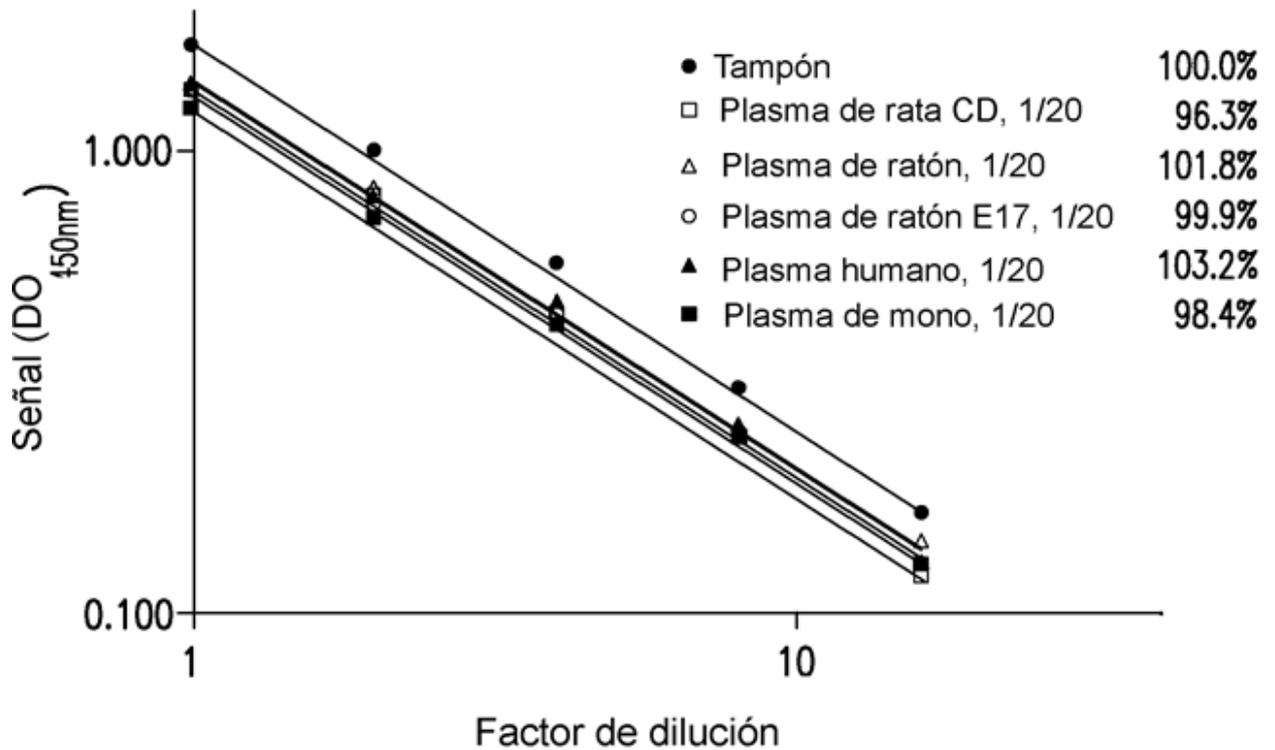


FIG. 8

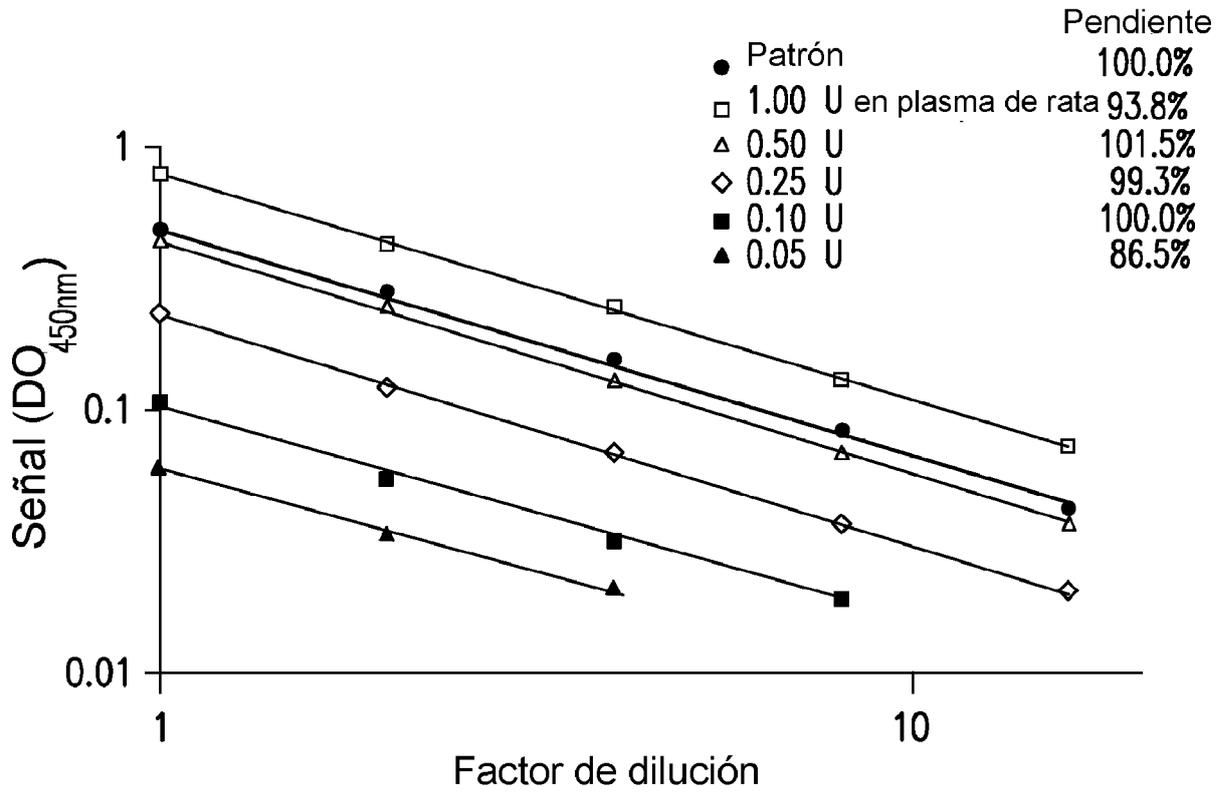


FIG. 9

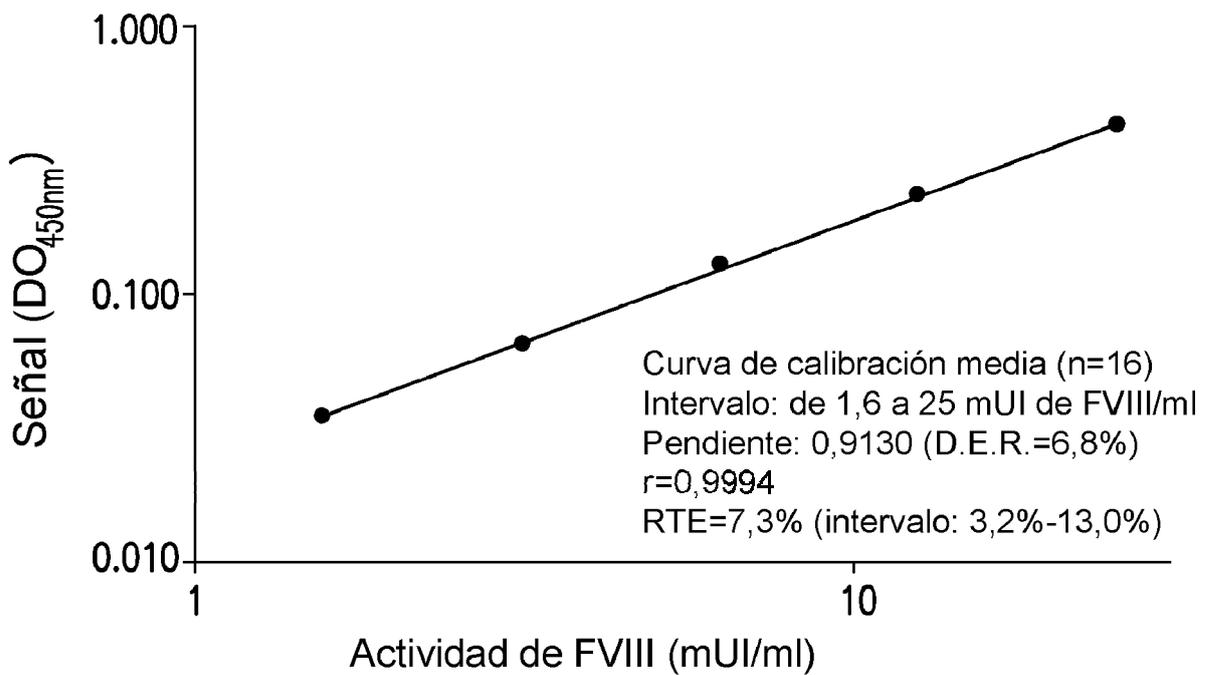


FIG. 10

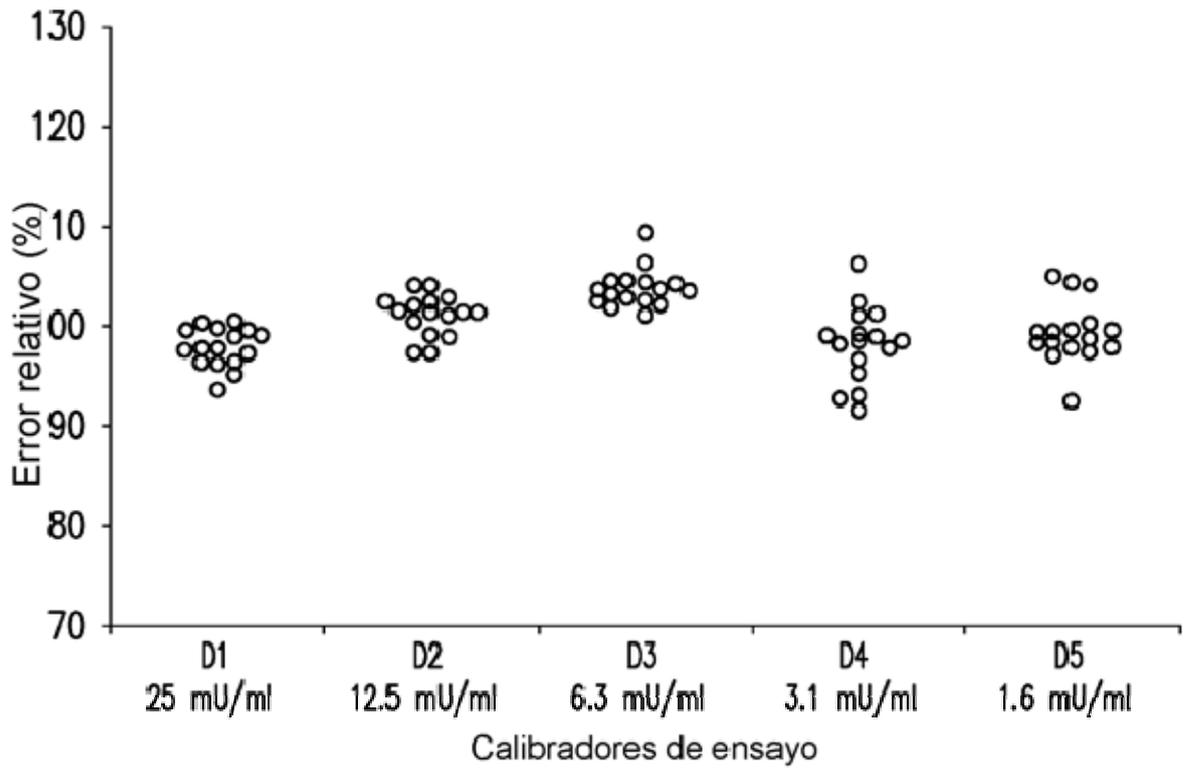


FIG. 11

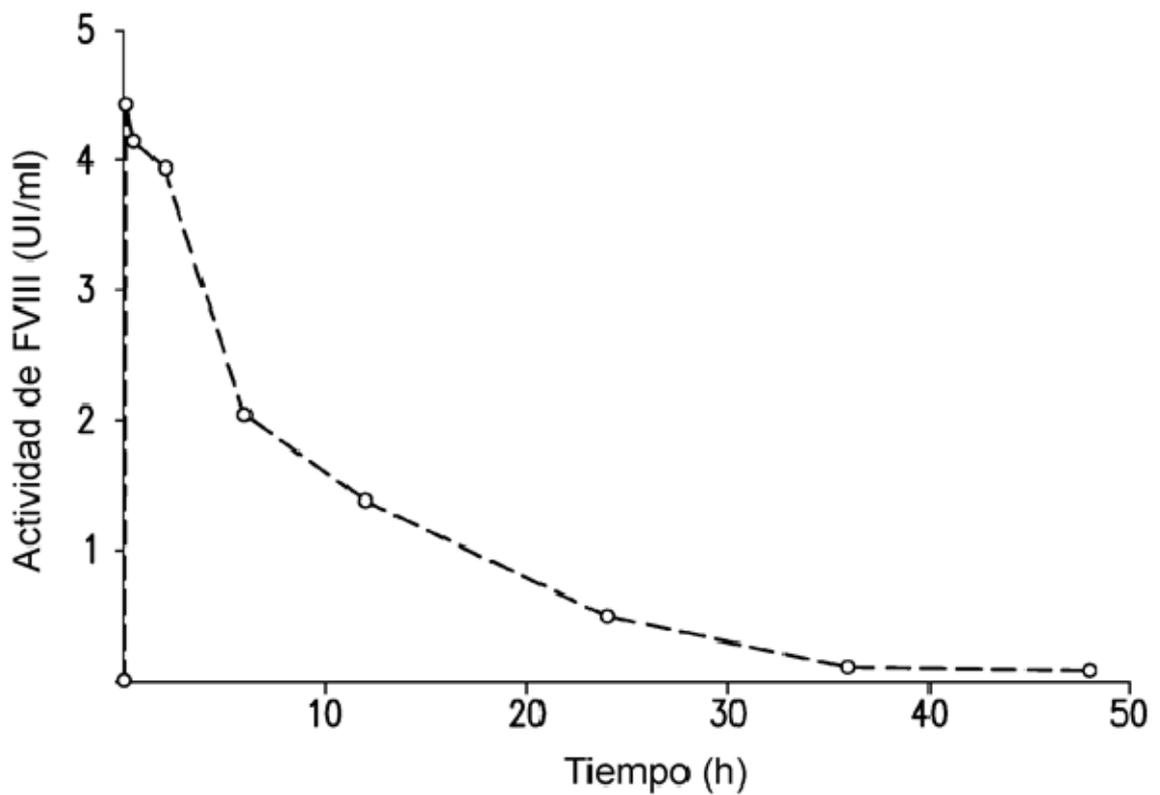


FIG. 12

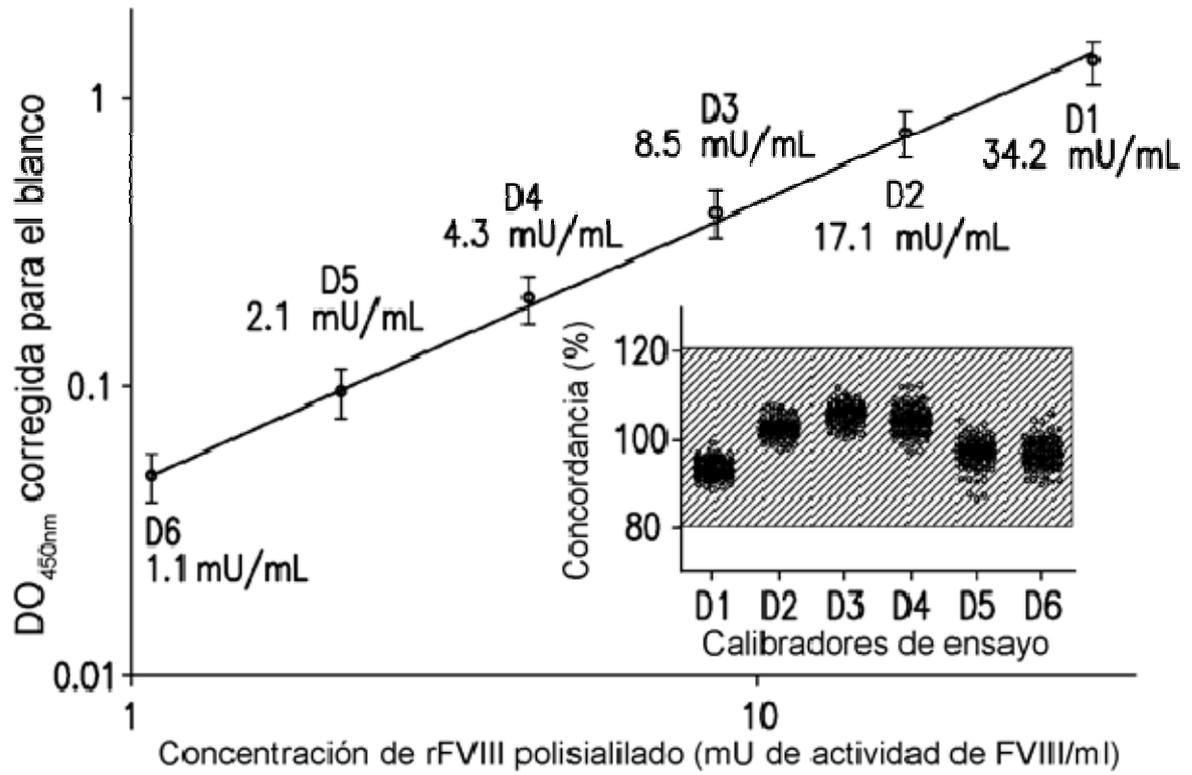


FIG. 13

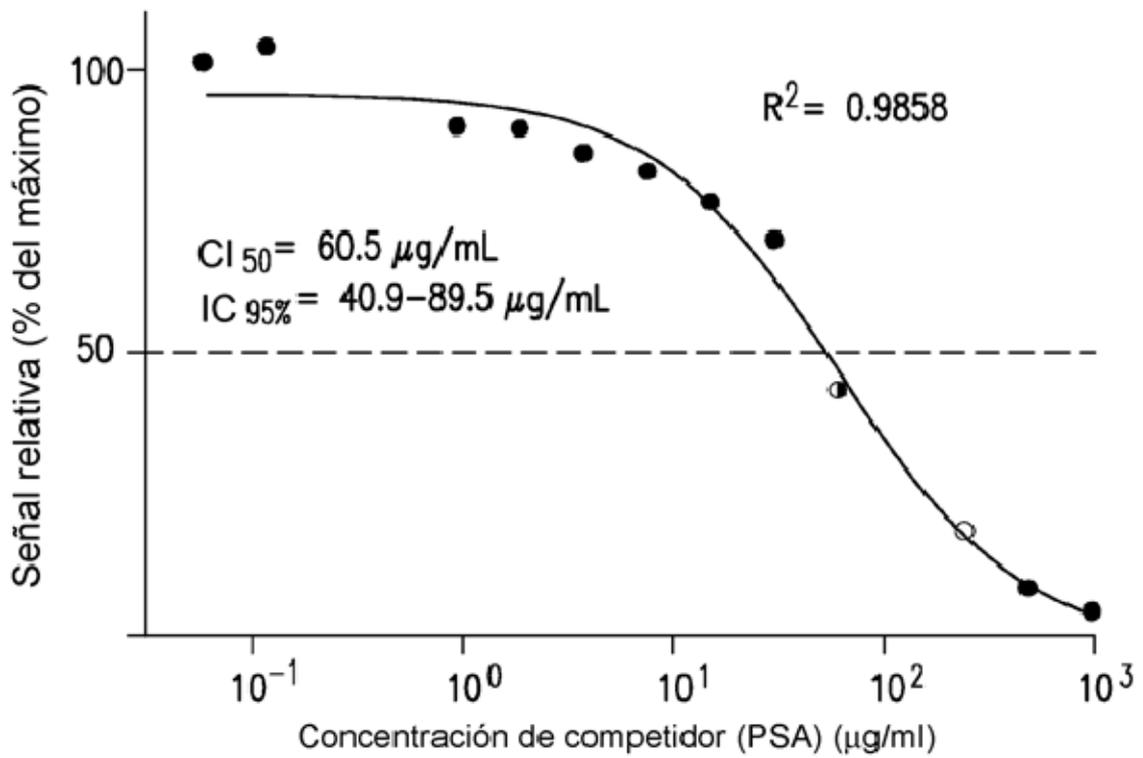


FIG. 14

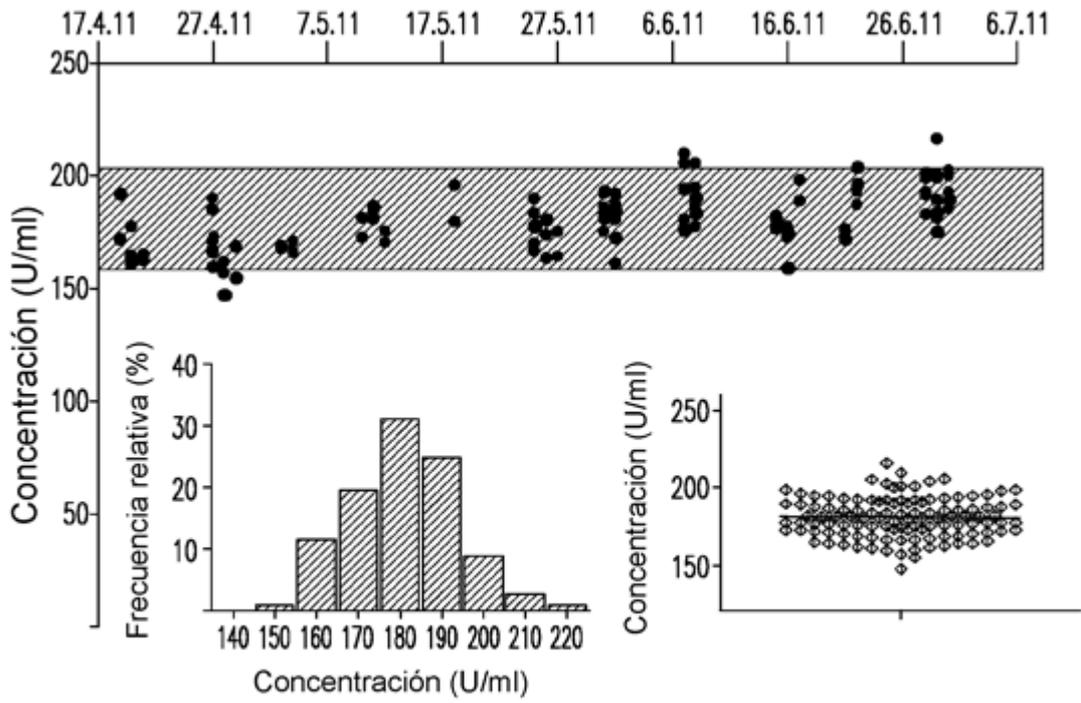


FIG. 15

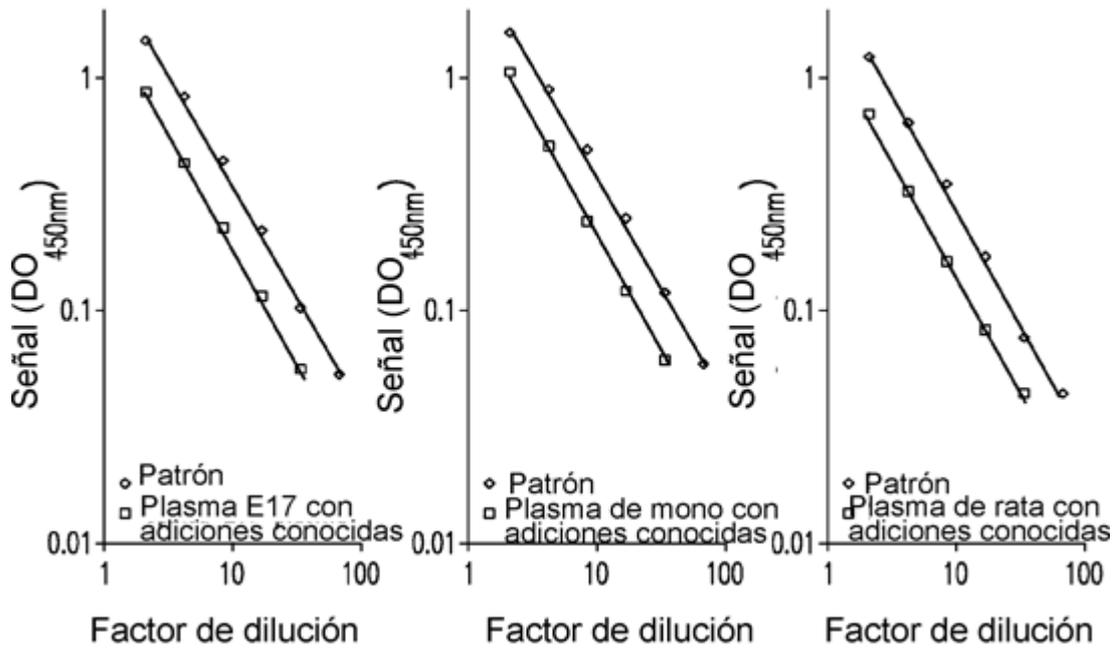


FIG. 16

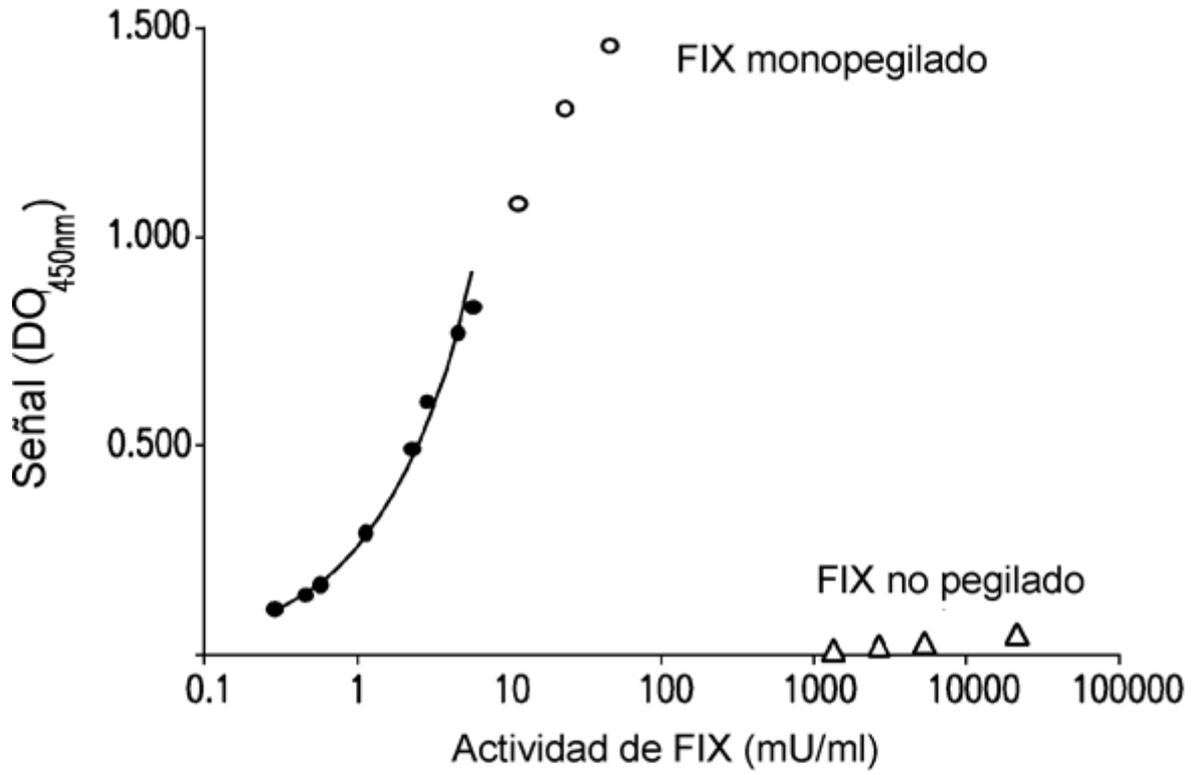


FIG. 17

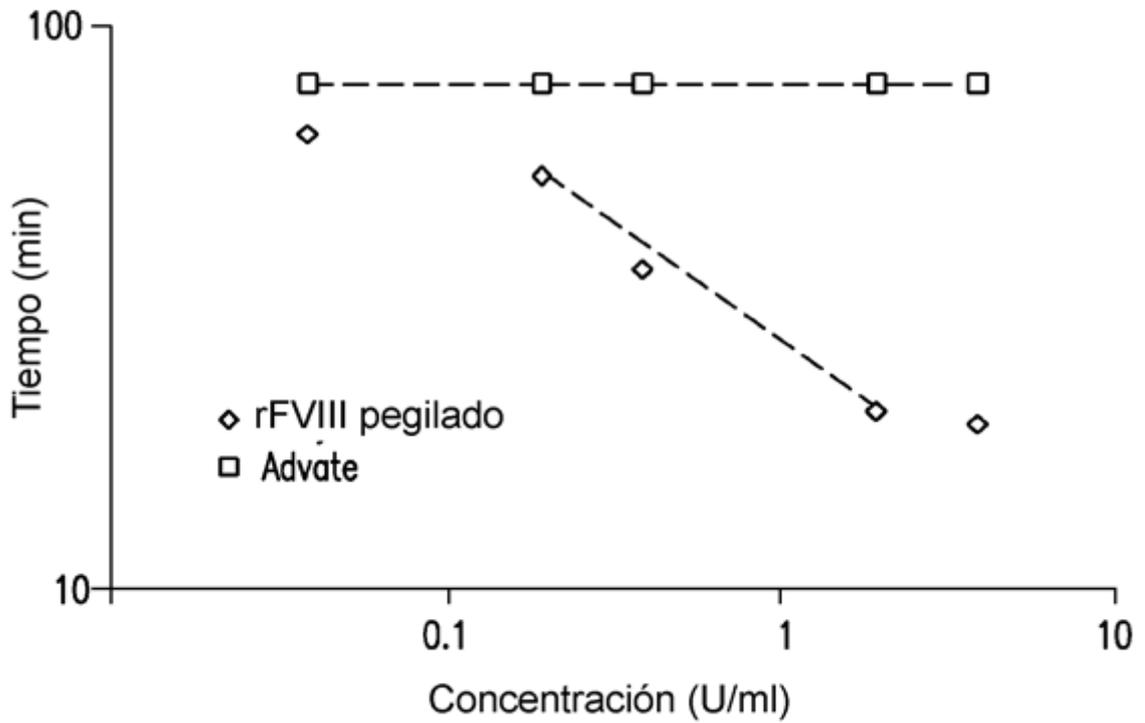


FIG. 18

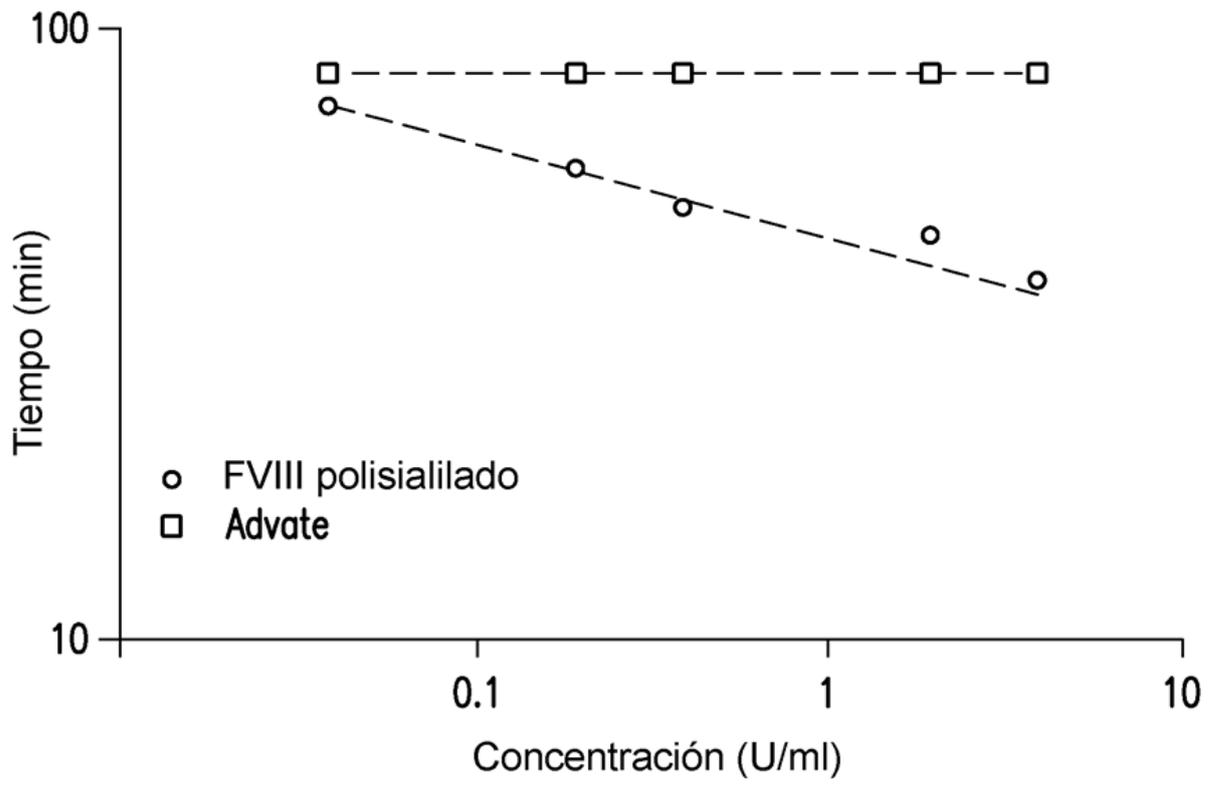


FIG. 19