

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 403**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07865898 .6**
- 96 Fecha de presentación: **20.12.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2097756**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.09.2009**

54 Título: **CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS.**

30 Prioridad:
21.12.2006 US 871378 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2012

73 Titular/es:
**NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**GRANDA, Brian Walter;
WALL, Daniel B. y
WANG, Yingqi Karen**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 374 403 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

Cuantificación de anticuerpos

5 La invención se relaciona con un nuevo método para determinar la cantidad de un anticuerpo interés en una muestra biológica. En una modalidad, el método de la invención se caracteriza porque comprende al menos una etapa de reducción de la proteína de dicha muestra biológica por medio de ingestión con pepsina para producir fragmentos F(ab)₂. En una modalidad preferida, uno o más péptidos que identifican la secuencia del anticuerpo de interés se controlan utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por medio de espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS).

Antecedentes de la invención

10 La habilidad para determinar en forma precisa y confiable las farmacocinéticas de compuestos farmacéuticos en una variedad de modelos preclínicos y de muestras clínicas es esencial para diseñar regímenes de dosificación para una eficacia óptima y una toxicidad mínima. Esto maximiza las posibilidades de éxito en la última etapa de los ensayos clínicos y es un componente necesario en el proceso regulatorio de aprobación. Debido a su alta probabilidad de éxito y reducidos períodos/costos de desarrollo, se están volviendo muy importantes los anticuerpos terapéuticos
15 monoclonales (mAb) para la industria farmacéutica. Estas proteínas son inmunoglobulinas (IgG) que actúan por medio del enlazamiento del objetivo e inhibiendo su actividad/reduciendo su concentración. El control de las concentraciones de mAb en suero comúnmente se lleva a cabo por medio de la utilización de ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Esta técnica es sensible (los LOQ son tan bajos como picogramos/mL) y lo suficientemente rápida para analizar miles de muestras. Sin embargo, tiene limitaciones significativas que
20 incluyen una pobre precisión (CV hasta del 30%) y exactitud. Además, puede estar sujeto a interferencias de la matriz tales como anticuerpos antifármaco y tiene un largo tiempo de desarrollo. Además, cuando se cambia entre modelos preclínicos, de muestras preclínicas a clínicas o deshumanización del anticuerpo para reducir efectos toxicológicos en el modelo preclínico, el ensayo necesita a menudo ser reconstruido. En consecuencia, sería útil desarrollar otros métodos para mejorar la confiabilidad de los datos y reducir los períodos/gastos de desarrollo.

25 La cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) es un método ampliamente utilizado para cuantificar compuestos farmacéuticos de molécula pequeña a partir de la crisis biológicas. Un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo que opera en modo de control de reacción múltiple (MRM) proporciona típicamente los LOQ más bajos, la especificidad más alta, la mejor precisión y exactitud y el rendimiento más alto, aunque también pueden ser empleados otros tipos de métodos de espectrometría de
30 masas. Únicamente recientemente se ha extendido esta tecnología la cuantificación de proteínas de muestras complejas tales como suero y lisados celulares (Gerber et al. (2003)). Esta tecnología es también descrita para la detección de conjugados anticuerpo-fármaco en la solicitud de patente PCT WO 2005/101017 (2005, Genetech). Para esta solicitud, se digiere generalmente la muestra con tripsina y se controlan los péptidos proteotípicos con HPLC-MS/MS y se utilizan para calcular la concentración de proteína. Las técnicas de preparación de las muestras
35 para este análisis implican típicamente la reducción de las proteínas más abundantes con los LOQ en el rango de 1 - 5 µg/mL (Anderson y Hunter (2006)). La reducción se logra con columnas de inmovilización o colorantes y tiene limitaciones significativas con respecto al costo, la capacidad y el rendimiento total del suero. Además, los kits de reducción pueden tener efectividad reducida para diferentes especies. Además, con los mAb, el único tipo de reducción factible a partir de fuentes comercialmente disponibles es albúmina. El enriquecimiento de los IgG puede
40 ser posible utilizando columnas o perlas de Proteína A/G, sin embargo, esta estrategia también sufre de limitaciones similares. La pepsina es una proteasa relativamente no específica que ha sido utilizada por muchos grupos para producir fragmentos de anticuerpos que retienen la habilidad para enlazar antígeno (F(ab)₂) de IgG (Rousseaux et al. (1980)). Recientemente, Jones y Landon (2002 y 2003) demostraron que se puede utilizar pepsina para la producción comercial de las F(ab)₂ a partir de muestras de suero ovino. La producción de F(ab)₂ a partir de suero
45 entero por medio de digestión con pepsina ha sido mostrada por Boushaba Rihab et al. Las velocidades de producción han sido medidas, pero no se ha determinado la concentración inicial de anticuerpo ("Kinetics of whole serum and prepurified IgG digestion by pepsin for F(ab)₂ manufacture". Biotechnology Progress; vol. 19, no.4, July 2003, páginas 1176 - 1182). La presente invención se deriva de la primera demostración de que enzimas como la pepsina pueden ser utilizadas para agotar el suero y enriquecerlo con F(ab)₂ como primera etapa en el ensayo para
50 cuantificación de los mAb del suero, por ejemplo, un ensayo basado en espectrometría de masas. Este enfoque es económico, universal (independientemente de la especie y del mAb de interés) y tiene capacidad ilimitada. Además, agota los péptidos asociados con la región Fc de las IgG. Estos péptidos son los más altamente conservados y los más abundantes. La remoción de estos reduce la supresión de iones por MS y disminuye el LLOQ.

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención se relaciona con un método *in vitro* para determinar la cantidad de un anticuerpo de interés en una muestra biológica, dicha muestra biológica comprendiendo además proteínas diferentes a los anticuerpos, caracterizado porque dicho método comprende las etapas de:

a) incubar la muestra biológica con una proteasa como la pepsina bajo condiciones apropiadas para proteólisis de las proteínas que no son de inmunoglobulina y la digestión de las moléculas de anticuerpo para producir fragmentos de anticuerpo que contienen al menos una región CDR; y,

5 b) determinar la cantidad de los fragmentos de anticuerpo derivados del anticuerpo de interés; dicha cantidad de fragmentos de anticuerpo correlacionada con la cantidad de anticuerpo de interés en la muestra biológica.

A menos que se establezca otra cosa, se utilizan aquí los siguientes términos y frases para que tengan el siguiente significado:

10 El término "anticuerpo", como se utiliza aquí, se refiere a la longitud completa o a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la habilidad para enlazarse específicamente con un antígeno. Se ha demostrado que la función de enlazamiento con el antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, los "fragmentos de enlazamiento". Los ejemplos de fragmentos de enlazamiento incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V_L , V_H , C_L y $CH1$; un fragmento $F(ab)_2$, un fragmento bivalente que contienen los fragmentos Fab engrasados por medio de un puente de disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y $CH1$; un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., 1989), que consiste de un dominio V_H ; y una región aislada determinante de complementariedad (CDR).

20 Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , son codificados por genes separados, pueden ser unidos, utilizando métodos recombinantes, por medio de un enlazador sintético que les permite a ellos ser elaborados como una sola cadena de proteína en la cual se aparean las regiones V_L y V_H para formar moléculas monovalentes (conocida como cadena individual Fv (scFv); ver por ejemplo, Huston et al., 1988). Tales anticuerpos de una sola cadena también están abarcados dentro del término "porción de enlazamiento del antígeno" de un anticuerpo.

25 El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad única de enlazamiento para un epítipo particular.

30 El término "péptido de interés" se refiere preferiblemente a un péptido comprendido en los fragmentos de anticuerpo generados por digestión como la de la pepsina que muestra propiedades cromatográficas y espectrométricas de masas experimentalmente ventajosas. En una modalidad, el péptido de interés o una combinación de péptidos de interés es única, es decir, puede ser encontrada únicamente en el anticuerpo de interés. Un desempeño cromatográfico ventajoso se define como picos estrechos con alta recuperación de péptido mientras que un buen desempeño espectrométrico de masas es indicado por medio de intensidades relativamente altas del ion principal y del fragmento de ion con un alto grado de selectividad para la secuencia del "péptido de interés".

35 El término "estándar interno" se refiere a una versión marcada del "péptido de interés" en donde la secuencia, estructura y propiedades químicas son similares a la del "péptido de interés" pero la masa es diferente. Por ejemplo, el "estándar interno" puede ser marcado con isótopos pesados tales como ^{13}C , deuterio y/o ^{15}N . Se pueden utilizar otras estrategias de marcación siempre que se cumplan los criterios anteriormente mencionados.

El término "anticuerpo de interés" se refiere al anticuerpo específico comprendido en una muestra biológica, que va a ser cuantificado.

40 El término "muestra biológica" significa (i) sangre, bilis, orina, o heces; (ii) extracto de tejido; y (iii) medio de cultivo celular, lisado celular, o extracto celular. Preferiblemente, la muestra biológica es suero de cualquier fuente biológica que contenga al anticuerpo de interés.

El término "fuente biológica" significa preferiblemente (i) fuente de mamífero tal como un ratón, una rata, un conejo, un perro, un mono, o un humano; e incluye tejido de mamífero; y/o células cultivadas de mamífero.

45 El término "cuantificación" significa determinar la cantidad relativa o absoluta de un producto químico, tal como un péptido o proteína, en una muestra biológica. La cantidad absoluta generalmente se determina en términos de rangos de concentración.

50 La presente invención se deriva del hallazgo de que ciertas proteasas pueden ser utilizadas para enriquecer una muestra biológica con fragmentos de anticuerpo que contienen al menos una región CDR tan como fragmentos $F(ab)_2$. De este modo se reduce en la muestra biológica las proteínas que no son de inmunoglobulina. Los fragmentos restantes estables de anticuerpo son luego adecuados para cuantificación con base en espectrometría de masas del anticuerpo de interés contenido en la muestra biológica.

Para facilidad de la lectura, las proteasas capaces de digerir proteínas que no son de inmunoglobulina, por ejemplo proteínas que no son de inmunoglobulina presentes en un suero, pero que retienen fragmentos de anticuerpo que contienen al menos una región CDR se denominan de ahora en adelante como "proteasas de tipo pepsina". Los ejemplos de tales proteasas como la pepsina incluyen, sin limitación, pepsina, papaína, elastasa, ficina, bromelaína o proteasa V8. Las "proteasas tipo pepsina" son aquellas capaces de retener al menos la región variable de anticuerpos y más preferiblemente los fragmentos F(ab) o F(ab)₂. La frase "fragmentos que retienen anticuerpo" significa que los fragmentos de anticuerpo son o bien no degradados por proteasas del tipo pepsina, o son más resistentes a la proteólisis que la mayoría de las otras proteínas presentes en la muestra biológica bajo condiciones de redacción apropiadas. El tiempo de incubación puede estar en el rango de minutos hasta días.

- 5
- 10 En una modalidad preferida, dicha proteasa como la pepsina es pepsina así como cualquiera de los homólogos u ortólogos adecuados de la misma, capaces de digerir proteínas que no sean de inmunoglobulina pero que retienen fragmentos estables de F(ab)₂. Por ejemplo, la pepsina de porcino se encuentra comercialmente disponible. Los homólogos u ortólogos adecuados de pepsina, compartirán al menos 50% de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos 80% y lo más preferible al menos 90% de identidad con la pepsina de porcino cuando se alinean con una alineación óptima. La alineación óptima de secuencias para determinar una ventana de comparación puede ser realizada por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981).

En una modalidad preferida, una concentración adecuada de la proteasa tipo pepsina, preferiblemente pepsina, para reducción de la proteína de una muestra biológica en el método de la invención está en el rango de 1:100 a 1:10 (p/p) de proporción de enzima:proteína.

- 20 En otra modalidad específica del método, la etapa b) comprende las siguientes sub-etapas de:

b1) adición de uno o más péptidos estándar internos a los fragmentos de anticuerpo generados en la etapa a) después que ha sido desactivada la digestión con pepsina;

b2) procesamiento de la muestra, es decir, digestión de la muestra obtenida en la etapa b1) con otra proteasa, preferiblemente, una proteasa que no sea pepsina, y opcionalmente, extraer los péptidos de la muestra;

- 25 b3) separación del péptido para reducir la complejidad de la muestra, es decir, separar parcialmente los péptidos de la muestra por medio cromatográfico y/o de otro medio en una o más muestras;

- 30 b4) análisis por espectrometría de masas de los péptidos de interés, es decir, medición por medio de espectrometría de masas de la masa o masas para cambiar la proporción de péptidos de la muestra presentes en una o más de las muestras separadas e identificar las señales de los picos correspondientes a los péptidos de interés del anticuerpo de interés así como los péptidos estándar internos; y,

- 35 b5) cuantificación de los péptidos de interés, por ejemplo, comparando dichas señales del pico con las señales del pico derivadas de una curva estándar de anticuerpo añadido en diferentes concentraciones conocidas en un material fuente que sirve de blanco utilizando el estándar interno para normalización de la señal para determinar la cantidad de los péptidos de interés en la muestra, determinando así la cantidad del anticuerpo interés contenido en la muestra biológica.

Procesamiento de la muestra:

La muestra resultante obtenida en la etapa b1) puede ser tratada adicionalmente en la etapa b2) con otra proteasa que no sea una proteasa "tipo pepsina". También se pueden utilizar juntas una o más proteasas, o con otras enzimas, para degradar así los componentes de la muestra.

- 40 Por ejemplo, la enzima proteolítica tripsina es una proteasa serina que escinde los enlaces peptídicos entre lisina o arginina y un aminoácido no específico para producir así péptidos que contengan un terminal amina (terminal N) y el aminoácido lisina o arginina en el terminal carboxilo (terminal C). De este modo los péptidos de la escisión de la proteína son específicos y predecibles y su presencia y/o cantidad, en una muestra a partir de una digestión con tripsina, puede ser indicativa de la presencia y/o cantidad de la proteína de su origen. Otros ejemplos de enzimas proteolíticas incluyen ArgC, LysC, proteasa V8 y AspN.

- 50 Por ejemplo, los fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo interés obtenidos por digestión con pepsina pueden producir tres péptidos (por ejemplo los péptidos A, B y C) cuando se digieren adicionalmente con una proteasa tal como tripsina. Por lo tanto, una muestra que ha sido digerida con una enzima proteolítica, tal como tripsina, y que cuando es analizada se confirma que contiene péptidos A, B y C, puede decirse que contiene originalmente el anticuerpo de interés. Si la digestión del fragmento F(ab)₂ por tripsina es completa, o se encuentran controles adecuados para explicar la digestión incompleta, cualquier determinación de la identidad y/o cantidad de uno o más de los péptidos

A, B y C en una muestra (o una fracción de los mismos), puede ser utilizada para identificar y/o cuantificar al anticuerpo interés contenido en la muestra original (o una fracción del mismo).

Opcionalmente, se extraen los péptidos de la muestra obtenidos después del procesamiento de la muestra, utilizando preferiblemente métodos de extracción apropiados para remover cualquiera de los materiales no deseados que pueden afectar, disminuir la sensibilidad y reproducibilidad de los resultados de los análisis por espectrometría de masas. Por ejemplo, se puede utilizar extracción en fase sólida (SPE), removiendo así las sales y detergentes en exceso, lípidos residuales en suero, péptidos no trípticos resultantes de la digestión con pepsina y materiales insolubles y permitiendo una concentración significativa de los péptidos en la muestra.

Separación de péptidos para reducir la complejidad de la muestra

En la etapa b3), con el propósito de analizar la mezcla de la muestra, se pueden separar parcialmente los péptidos y se lleva a cabo un análisis de masas solamente sobre una fracción de la mezcla de la muestra. De este modo, se puede reducir sustancialmente la complejidad del análisis ya que los péptidos separados pueden ser analizados individualmente por masas incrementando de este modo la sensibilidad del proceso de análisis. Desde luego se puede repetir el análisis una o más veces sobre una o más fracciones adicionales de la mezcla de la muestra para permitir así el análisis de todas las fracciones de la mezcla de la muestra.

Se pueden utilizar las condiciones de separación bajo las cuales un péptido(s) casi idéntico(s) de interés y péptidos estándar internos que están marcados en forma diferencial eluyen en forma conjunta o eluyen en forma casi conjunta a una concentración, o en una cantidad, que está en proporción con su abundancia en la mezcla de la muestra, para determinar la cantidad de cada péptido en cada una de las muestras que incluyen la mezcla de la muestra. Como se estableció anteriormente en la sección b5, se puede determinar la cuantificación del(de los) péptido(s) de interés, y por lo tanto el anticuerpo interés, por medio del uso de un péptido(s) estándar interno(s) añadido(s) en cada muestra después de que ha sido desactivada la pepsina. Se genera también una curva estándar de concentraciones conocidas del anticuerpo de interés en una matriz biológica utilizada como blanco con cantidades fijas del(de los) péptido(s) estándar interno(s). La cantidad del anticuerpo de interés en cualquier muestra de la misma o de una matriz similar, que contiene el mismo estándar interno, puede así ser calculada a partir de la curva estándar. Una presunción clave de este enfoque es que el anticuerpo introducido en la curva estándar experimentará una preparación similar de la muestra y los efectos relacionados con la eficiencia de la digestión para el mismo anticuerpo de las muestras del ensayo. De este modo, es razonable utilizar la curva estándar del anticuerpo introducido en la matriz del blanco, junto con el(los) péptido(s) estándar interno(s), para cuantificar al anticuerpo de las muestras en el estudio, donde se utiliza el mismo estándar interno. Además, el estándar interno sirve para normalizar las intensidades de la señal del MS y reducir así la variabilidad de algunas etapas de la preparación de la muestra y el análisis. Por lo tanto, en algunas modalidades, la separación de la mezcla de la muestra puede simplificar el análisis mientras se mantiene la correlación entre las señales determinada en el análisis de masas (por ejemplo, el análisis MS/MS) para el(los) péptido(s) estándar interno(s) y el(los) péptido(s) de interés en la mezcla de la muestra.

En ciertas modalidades, se puede realizar la separación por medio de cromatografía. Cualquier proceso cromatográfico de separación adecuado para separar el(los) péptido(s) de interés puede ser utilizado. La separación cromatográfica puede ser una cromatografía en fase normal, una cromatografía en fase reversa, una cromatografía de intercambio iónico, una cromatografía de exclusión por tamaño o una cromatografía de afinidad. Por ejemplo, se puede utilizar cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS) para efectuar tal separación de la muestra y análisis de masas. En una modalidad preferida, se lleva a cabo la etapa de separación b3) por medio de HPLC.

Análisis por espectrometría de masas de los péptidos de interés

Los métodos de la invención son apropiados para el análisis de péptidos derivados del anticuerpo de interés en las muestras biológicas donde el(los) péptido(s) de interés son primero cargados, separados, o parcialmente separados por medio de uno o más de los procesos de separación descritos más adelante. Para cuantificación selectiva del anticuerpo interés, el(los) péptido(s) de interés incluye(n) preferiblemente al menos una porción seleccionada en la región variable del anticuerpo de interés. El(los) péptido(s) debe(n) adicionalmente ser seleccionados de la porción de la secuencia de aminoácidos que permite la discriminación de las señales del pico correspondientes específicamente a los fragmentos del anticuerpo de interés de la señal no específica correspondiente a otros fragmentos de proteína, o secuencias conservadas de aminoácidos entre los anticuerpos. Las secuencias de tal(es) péptido(s) de interés puede ser seleccionadas entre aquellas que contienen residuos únicos de aminoácidos dentro de las regiones variables de cadena liviana y/o pensada de un anticuerpo cuando se las compara con las correspondientes secuencias nativas de las IgG obtenidas a partir de una base de datos de las secuencias nativas de las IgG. Idealmente, el(los) péptido(s) de interés debe(n) tener buenas propiedades cromatográficas y de ionización, sin residuos altamente susceptibles de modificación (tales como metionina) y sin un fondo detectable de la IgG total de la especie de interés, por ejemplo, IgG humana total.

Preferiblemente, en la etapa b4), la identificación de la masa o de la masa para cargar las proporciones de las proteínas digeridas, que incluyen el(los) "péptido(s) de interés", en una muestra separada puede ser realizada por medio de cualquiera de los espectrómetros de masa con la suficiente selectividad y sensibilidad disponibles en estado del arte.

- 5 Se puede llevar a cabo utilizando por ejemplo espectrómetros de masa en tándem y otros espectrómetros de masa que tengan la habilidad para seleccionar y fragmentar iones moleculares. Los espectrómetros de masa en tándem (y en menor medida los espectrómetros de masa de una sola etapa) tienen la capacidad de seleccionar y fragmentar iones moleculares de acuerdo con su relación masa a carga (m/z), y luego registrar el espectro iónico del fragmento resultante (hijo). Más específicamente, el espectro iónico del fragmento hijo puede ser generado sometiendo los iones seleccionados a niveles de energía disociativos (por ejemplo, disociación inducida por colisiones (CID)). Por ejemplo, los iones correspondientes a péptidos marcados de una relación m/z particular pueden ser seleccionados a partir de un primer análisis de masas, fragmentados y analizados en un segundo análisis de masas. Los instrumentos representativos que pueden llevar a cabo tal análisis de masas en tándem incluyen, pero no se limitan a, espectrómetros de masas de cuatro sectores magnéticos, de tiempo de vuelo en tándem, de cuadrupolo triple, de trampa de iones, y de tiempo de vuelo de cuadrupolo híbrido (Q-TOF).

- En una modalidad preferida, se lleva a cabo la etapa b4) por medio de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Preferiblemente, se utiliza un cuadrupolo triple para el control de una reacción múltiple (MRM) para un análisis de masas en tándem. En resumen, en el MRM, se utiliza el primer cuadrupolo para aislar la masa original del péptido. La masa original es representativa de la secuencia total del péptido. Luego pasa dentro del cuadrupolo de colisión donde es fragmentada. Se utiliza el tercer cuadrupolo para controlar iones de fragmentos seleccionados. Los fragmentos generados son indicativos de la secuencia interna del péptido.

Quantificación de los péptidos de interés:

Las mediciones cuantitativas del(de los) péptido(s) de interés pueden ser optimizadas a partir del análisis de masas en la etapa b4).

- 25 En algunas modalidades, la cuantificación del(de los) péptido(s) de interés normalizado(s) con un(os) péptido(s) análogo(s) que sirve(n) como estándar(es) interno(s) puede ser lograda utilizando los cálculos a partir de una curva estándar.

- En otras modalidades, se puede determinar la cuantificación absoluta del(de los) péptido(s) de interés. Las mediciones cuantitativas del(de los) péptido(s) de interés se llevan a cabo preferiblemente por medio de su de un péptido(s) que sirve(n) como estándar(es) interno(s). El(los) péptido(s) como estándar(es) interno(s) y opcionalmente el(los) péptido(s) de interés son por ejemplo marcados en forma diferencial de tal manera que tal(es) estándar(es) interno(s) sea(n) estructural y químicamente similares al(a los) péptido(s) de interés, aunque la masa sea diferente debido a la etiqueta. De este modo, el eluyente del proceso de separación incluye una cantidad del(de los) péptido(s) que está en proporción con la cantidad conocida de aquel(aquellos) péptido(s) que sirve(n) como estándar(es) interno(s) en la muestra, como el preparado. Luego es posible relacionar la cantidad del(de los) péptido(s) de interés en la muestra con las cantidades del anticuerpo de interés a partir de las cuales se originan a través de la curva estándar. En una modalidad preferida, el(los) péptido(s) que sirve(n) como estándar(es) interno(s) son marcados en forma isotópica por ejemplo deuterados, incubados a una concentración definida con los fragmentos de anticuerpo después de la desactivación de la pepsina, por ejemplo.

- 40 Como se utiliza aquí, "marcado en forma isotópica" se refiere a un péptido que ha sido enriquecido en forma sintética con uno o más isótopos de átomos pesados (por ejemplo, isótopos estables tales como Deuterio, ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{37}Cl o ^{81}Br).

- La curva de calibración cuantitativa se genera utilizando una serie de diluciones del anticuerpo de interés en una matriz ideológica que sirve como blanco, tal como suero. Cada muestra es procesada en la misma forma que las muestras reales del ensayo. El(los) péptido(s) que sirve(n) como estándar(es) interno(s) se añaden, en una cantidad fija conocida a cada una de las diluciones de la curva de calibración, justo después de que se ha desactivado la digestión con pepsina tal como con las muestras del ensayo. Una vez que se completa la digestión con proteasa triptica, o con otra proteasa específica, la muestra contendrá un nivel conocido del péptido que sirve como estándar interno y se utiliza algo de la población del péptido de interés que fue producida a partir de la digestión del anticuerpo de interés. La relación de las intensidades de señal del(de los) péptido(s) interés con respecto a las intensidades de señal del(de los) péptido(s) que sirve(n) como estándar(es) interno(s) en las series de dilución se utiliza para crear una curva de calibración. Estos datos de la curva de calibración pueden ser luego aplicados a las muestras del ensayo para cuantificar el anticuerpo de interés debido a que el procedimiento utilizado y la cantidad del estándar interno son idénticos.

La cuantificación del(de los) péptido(s) de interés, con base en el estándar interno y en la curva de calibración, permiten de este modo la determinación de la cantidad del anticuerpo interés que estaba originalmente presente en la muestra biológica.

- 5 Los siguientes ejemplos tienen el propósito de servir de ilustración únicamente y no deben constituirse en una limitante del alcance de la invención, como se definen en las reivindicaciones que acompañan a la misma.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Gel para SDS-PAGE de suero humano digerido con diferentes cantidades de pepsina de porcino.

Figura 2: Cromatograma representativo de HPLC-MS/MS de suero humano al cual se le ha introducido mAb X obtenido durante la validación abreviada.

- 10 Figura 3: Curva estándar representativa del péptido H-T4 que demuestra la linealidad y el rango.

Figura 4: Concentración de mAb X versus tiempo: comparación de los datos de ELISA y HPLC-MS/MS para mAb X administrado en forma intravenosa en una rata.

Ejemplo

- 15 El ejemplo a continuación describe en forma detallada una modalidad específica del método de la invención para cuantificar un anticuerpo interés en una muestra de suero, que será denominada en adelante como mAb X.

1. Desarrollo del método

Reducción de la pepsina

Evaluación

- 20 Para evaluar la eficacia de la pepsina para agotar el suero humano y enriquecerlo selectivamente con F(ab)₂, se ajustaron alícuotas de 50 µL DE suero humano reunido obtenido comercialmente (Equitech Bio) a pH 3,5 con ácido clorhídrico diluido y se digirió durante la noche con diferentes concentraciones de pepsina de porcino (Roche Applied Science Cat. # 03 117 901 001) a 37°C asumiendo aproximadamente 100 mg/mL de proteína total en suero. Los digeridos con la pepsina fueron corridos junto a suero humano no tratado sobre un gel al 4 - 12% NUPAGE Novex (In Vitrogen) bajo condiciones no reductoras utilizando amortiguador para corrimiento MES a 200 V constante
- 25 durante 40 minutos, teñido con Azul de Coomassie (Bio-Rad), decolorado y posteriormente escaneado utilizando una Cabina Alpha Innotech MultiImage Light. La Figura 1 demuestra que la pepsina reduce exitosamente al suero humano mientras produce los F(ab)₂ estables incluso con altas concentraciones de enzima. La pepsina es adecuada para ser usada en concentraciones en el rango de 1:100 a 1:10 (p/p) de proporción de enzima:proteína. Puede ser posible utilizar concentraciones mayores aunque esto no fue evaluado.

- 30 *Protocolo optimizado*

Instrumentación

- 35 El sistema de HPLC-MS/MS constaba de un sistema de LC capilar Agilent 1100 (bomba capilar, automuestreador y desgasificador), un calentador de columna Analytical Sales Hot Sleeve™ y un espectrómetro de masas 4000QTRAP de Applied Biosystems operando como un cuadrupolo triple equipado con una fuente de nanoelectronebulización utilizando una New Objective 50 micron ID metal Taper Tip™ como aguja para la electronebulización. El sistema fue corrido utilizando un programa Analyst 1.4.

Selección del péptido

- 40 La primera etapa para determinar si mAb X es adecuado para ser utilizado en un ensayo farmacocinético con base en HPLC-MS/MS es llevando a cabo un análisis para identificar los residuos más singulares en las regiones de la cadena pesada variable y de la cadena liviana variable del anticuerpo. Éstos pueden ser encontrados en la porción del Fab de la molécula, haciendo posible la estrategia de reducción basada en la pepsina. Este análisis se hace *in silico* contra las IgG humanas. Cuando se selecciona al candidato putativo para cuantificación, idealmente, el péptido debe: tener buenas propiedades cromatográficas y de ionización, no debe tener residuos altamente susceptibles a modificación (tales como metionina) y no debe tener un fondo en las IgG humana totales. Con base en estos
- 45 criterios, se escogió un péptido, denominado de ahora en adelante como H-T4 y correspondiente un fragmento del

5 péptido en la cadena pesada. Se sintetizó el estándar interno (IS) marcado con un isótopo estable, con un análogo deuterado de valina. El IS fue introducido en una concentración constante en todas las muestras y estándares para normalizar la señal. Esto ajustó las variaciones por manipulación de la muestra y los análisis tales como de una corrida a otra y de una muestra a otra, preparación de la muestra, eficiencias en la ionización y los volúmenes de inyección.

Condiciones de la espectrometría de masas

10 Se reconstituyó el IS en agua hasta una concentración de 1mM. Se diluyó adicionalmente hasta 0,5 nM en acetonitrilo al 30%, ácido fórmico al 0,1% e inyectó directamente en el espectrómetro de masas. Se utilizó la herramienta de optimización cuantitativa en el programa Analyst 1.4 para optimizar las condiciones de MRM. En resumen, en MRM, se utiliza el primer cuadrupolo para aislar la masa original del péptido. La masa original es representativa de la secuencia completa del péptido. Este pasa luego dentro del cuadrupolo de colisión donde es fragmentado. Se utiliza el tercer cuadrupolo para controlar fragmentos seleccionados de iones. Los fragmentos generados son indicativos de la secuencia interna del péptido. Tomados junto con las masas Q1 y Q3 representan diferentes transiciones y, apropiadamente escogidas, son altamente específicas para la secuencia. En este caso, se escogieron las dos transiciones más intensas después de la optimización por medio del programa y se sumaron. La escogencia de transiciones múltiples incrementa la selectividad del análisis. La Tabla 1 muestra las condiciones optimizadas de MS para un péptido específico de interés y el estándar interno. Q1 y Q3 fueron operados con resolución unitaria.

Tabla 1. Parámetros optimizados de MRM para los péptidos H-T4 e IS.

Masa de Q1	Masa de Q3	Energía de la colisión	Potencial de salida de la colisión	Tiempo de permanencia (ms)
786,40	886,90	30	28	100
786,40	936,40	30	26	100
789,10	890,90	30	28	100
789,10	940,40	30	26	100
Cortina	20		Nebulización de iones	3250
Gas	10		(V)	20
EP	0		GS1	200
GS2	10		IHT	50
CAD			DP (V)	

20

Condiciones finales de HPLC

25 La columna de HPLC era una Zorbax C8 Stablebond300 de 0,3 x 75 mm y fue calentada a 60°C. Se establecieron la velocidad de flujo en 5 µL/min. La fase móvil A estaba compuesta de ácido fórmico al 0,1% en agua y la fase móvil B era de ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. Se utilizó un gradiente para eluir el péptido en el espectrómetro de masas. Los primeros 12,5 minutos del flujo fueron desviados hacia los desechos, se conmutó el flujo en línea durante los siguientes 6 minutos seguido por el desvío nuevamente hacia los desechos durante el resto del tiempo del análisis para reducir la contaminación potencial de la fuente.

Tabla 2. Condiciones del gradiente para HPLC

Tiempo (Min)	% del Solvente B
0,0	10,0
10,0	10,0
17,5	28,0
20,0	90,0
30,0	90,0
32,5	10,0
47,5	10,0

Tratamiento de la muestra y del estándar

- 5 Para el estudio farmacocinético y las muestras de validación, se pipetearon 20 - 50 μL de suero por muestra en una placa de 2 mL de 96 pozos. Se ajustó el pH de las muestras a $3,5 \pm 0,25$ por medio de la adición de ácido clorhídrico 333 mM hasta una concentración final de 67 mM. Se añadió posteriormente pepsina (20 mg/mL en agua) hasta una concentración final de 2 μg de pepsina/ μL de suero y se cubrió la placa, se centrifugó brevemente, y agitó por medio de un vórtice. Se hizo la digestión durante la noche a 37 °C en un horno.

Digestión triptica

- 10 Después de completar la digestión con pepsina, se diluyeron las muestras hasta 475 μL con urea 2 M, β -octilglucopiranosido al 1% (OG), DTT 10 mM, bicarbonato de amonio 50 mM pH 7,8 y se agitó la placa por medio de un vórtice. Elevando el pH por encima de 6,0 se inactiva la pepsina en forma irreversible. La urea y el OG actúan para desnaturalizar las proteínas y solubilizar cualquiera de las proteínas precipitadas/agregados de bajo peso molecular formados como resultado de la digestión con pepsina. Se introdujeron 2,5 pmoles de IS en cada muestra.
- 15 Se incubó la placa a 37 °C durante dos horas en un horno para facilitar la reducción del enlace disulfuro por medio de DTT. Se añadió IAA hasta una concentración final de 20 mM y se incubó la placa a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 hora para carboxamidometilar residuos libres de cisteína. Se preparó tripsina de bovino (Sigma Cat. # T-1426) a razón de 2,5 mg/mL en ácido clorhídrico 1 mM y se añadieron 0,5 μg de tripsina/ μL de Suero. Se cubrió la placa, se centrifugó brevemente, y agitó por medio de un vórtice. Se digirieron las muestras durante la
- 20 noche a 37 °C en un horno. Se añadió ácido fórmico al día siguiente hasta una concentración final de 1% (v/v) para terminar la digestión.

Extracción en fase sólida

- 25 Se limpiaron las digestiones por medio de extracción en fase sólida (SPE) utilizando placas de 30 mg, 30 μm de 96 pozos Oasis MCX (Waters Corp.) en un colector múltiple al vacío. Este remueve el exceso de sales, detergente, lípidos residuales del suero, péptidos no tripticos resultantes de la digestión con pepsina y materiales insolubles que pueden obstruir el instrumento, disminuir los LOQ o bien reducir la robustez y reproducibilidad del ensayo. Esto permite también una concentración significativa de las muestras. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante con modificaciones menores. En resumen, se lavaron previamente los pozos de Oasis MCX con 1,0 mL de metanol seguido por 1,0 mL de agua grado HPLC. Se cargaron las muestras y luego se las lavó con 2 x 1,0 mL de ácido acético al 1% seguido por 2 x 1,0 mL de metanol. Posteriormente, se utilizaron 1,0 mL de hidróxido de amonio al 5% en metanol al 50%, se utilizó etanol al 45% para eluir en placas de recolección de 96 pozos de 2 mL. Se evaporaron las muestras hasta sequedad y se almacenó a $\leq -50^\circ\text{C}$. Antes del análisis por HPLC-MS/MS, se reconstituyeron en forma fresca las digestiones en ácido trifluoroacético al 1%. Se inyectaron 2,5 μL de equivalente de suero en una columna de HPLC.

- 35 2. Método de evaluación

Validación abreviada

Se llevó a cabo una validación limitada en suero humano del método de HPLC-MS/MS con el propósito de demostrar el desempeño adecuado del método de acuerdo con los lineamientos aceptados para enfoque con base en ELISA (DeSilva et al. (2003) y Smolec et al. (2005)). Se recolectó suero humano de cuatro individuos voluntarios sanos, 2 hembras y 2 machos. Se introdujo el anticuerpo de interés, mAb X, en una muestra de suero a razón de 250 µg/mL y en los otros tres a razón de 50 µg/mL. Se diluyeron en forma serial dos de las muestras a las cuales se les introdujo el anticuerpo a razón de 50 µg/mL con el suero correspondiente hasta 5,0 µg/mL y 0,5 µg/mL, respectivamente. Se prepararon las muestras por triplicado y se analizaron en las tres ocasiones utilizando alícuotas de 50 µL para cada réplica. Se prepararon curvas estándar por medios de dilución serial de una reserva de suero humano obtenido comercialmente (Equitech Bio) de 500 a 0,1 µg/mL y se llevó a cabo el procedimiento completo (3 replicas/punto).

Estudio farmacocinético en ratas - Comparación con ELISA

Se obtuvo una comparación con ELISA analizando muestras de una rata dosificada con mAb X a razón de 10 mg/kg con el método de HPLC-MS/MS. Se llevó a cabo el ELISA utilizando un protocolo estándar con un anticuerpo Fc antihumano para captura seguido por un anticuerpo Fab antihumano para detección para determinar las farmacocinéticas de mAb X en una rata. Para el análisis de MS, debido al limitado volumen de la muestra, se preparó una sola muestra de suero de cada punto de tiempo (20 µL de suero) y se analizó por triplicado. Se preparó la curva estándar por medio de dilución serial de mAb X con un reservorio de suero de rata obtenido en el comercio (Sigma-Aldrich) de 500 a 0,5 µg/mL de mAb X y se llevó a cabo el procedimiento completo de preparación de la muestra (3 replicas/punto). Además, se analizó la introducción en suero de rata de mAb X a razón de 50 µg/mL, 5 µg/mL y 0,5 µg/mL para determinar la exactitud en esta matriz.

Resultados

Validación abreviada

La Figura 2 es un cromatograma representativo de HPLC-MS/MS de introducción de anticuerpo obtenido durante la validación abreviada que demuestra la elución conjunta del IS con el péptido de interés (llamado de ahora en adelante en el ejemplo específico H-T4).

Linealidad y Rango

Se evalúa el rango dinámico de linealidad como la habilidad del método para producir una señal que sea directamente proporcional a la concentración sobre un rango dado. El rango es el intervalo entre los niveles superior e inferior de analito que se ha demostrado que se determina con precisión y exactitud adecuadas. Utilizando regresión lineal a través de cero con ponderación 1/x el método de MRM para mAb X era lineal desde 0,5 hasta 500 µg/mL con $R^2 \geq 0,999$ para los tres ensayos (Figura 3). Este es un rango dinámico de orden de magnitud tres y es consistente con aquel reportado en la literatura para MRM. Debe observarse que las concentraciones por encima de 500 µg/mL no fueron evaluadas en este estudio. Puede ser posible extender el rango más allá del estimado actual. Se reporta que el QTRAP es capaz de un rango dinámico lineal de 3,5 a 4 órdenes de magnitud.

35 Precisión y exactitud

La exactitud del método es una medida del grado de concordancia del valor medido con el valor verdadero o aceptado. Sobre el rango de 0,5 a 250 µg/mL, el porcentaje de exactitud (o porcentaje de recuperación) de anticuerpos introducidos a través de los tres ensayos estaba dentro del 10% del valor teórico.

40 Precisión es una medida de la reproducibilidad del método a cualquier concentración dada. La precisión se expresa a menudo como el coeficiente de variación (CV) de mediciones repetidas y usualmente se evalúa tanto dentro como entre los ensayos. Los CV diarios dentro y entre para todas las concentraciones fueron inferiores al 7%.

Límite de cuantificación

45 El límite de cuantificación (LOQ) se define como aquella concentración a la cual los resultados cuantitativos pueden ser reportados con un alto grado de confiabilidad y para la cual la relación de señal:ruido (S/N) es al menos de 10:1. Dados estos criterios, se calculó la relación S/N para el nivel de anticuerpo introducido de 0,5 µg/mL por medio de la determinación de la intensidad absoluta de la señal para el pico de H-T4 y comparándola con la intensidad del ruido en la región de un minuto después del pico. La relación S/N fue de $34,4 \pm 8,8$ a través de los tres ensayos. El LOQ debe ser de 0,25 µg/mL que es adecuado para calcular la vida media para la mayor parte de los regímenes de dosificación preclínicos comunes.

50 Selectividad (Especificidad)

La especificidad de un ensayo es la habilidad para evaluar en forma inequívoca al analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente estos pueden incluir impurezas, productos de degradación, y componentes de la matriz. Para evaluar la especificidad del método de HPLC-MS/MS, se analizaron muestras de suero usadas como blanco de cada uno de los cuatro individuos y el reservorio de suero obtenido en el comercio. El H-T4 de mAb X no fue detectado en ninguno de los blancos en ninguno de los ensayos realizados.

Estudio farmacocinético en ratas - Comparación con ELISA

La Figura 4 representa una comparación del método de HPLC-MS/MS con ELISA. Se observó una concordancia muy estrecha entre los métodos. Además, las introducciones de anticuerpo en suero de rata estaban dentro del 6% de los valores teóricos reforzando así la exactitud del método de HPLC-MS/MS obtenida durante la validación abreviada.

REFERENCES

- Anderson L, Hunter CL (2006) Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics*; 5(4): 573 - 588.
- DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, Khan M, Tacey R, Hill H, Celniker A (2003) Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm Res*; 20(11): 1885 - 1900.
- Gerber S. A., Rush J, Stemman O, Kirschner M. W., Gygi S. P. (2003) Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci*; 100(12): 6940 - 6945.
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett, H. M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., et al. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*; 85: 5879 - 5883.
- Jones R. G., Landon J (2003) A protocol for 'enhanced pepsin digestion': a step by step method for obtaining pure antibody fragments in high yield from serum. *J Immunol Methods*; 275(1 - 2): 239 - 250.
- Jones R. G., Landon J (2002) Enhanced pepsin digestion: a novel process for purifying antibody F(ab')(2) fragments in high yield from serum. *J Immunol Methods*; 263(1 - 2): 57 - 74.
- Rousseaux J, Biserte G, Bazin H (1980) The differential enzyme sensitivity of rat immunoglobulin G subclasses to papain and pepsin. *Mol Immunol*; 17(4): 469 - 482.
- Smith, T. F. and Waterman, M. S. (1981) Overlapping Genes and Information-Theory *J Theoret Biol*, 91, 379 - 380.
- Smolec J, DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelly M, Lee B, Khan M, Tacey R, Hill H, Celniker A, Shah V, Bowsher R, Mire-Sluis A, Findlay JW, Saltarelli M, Quarmby V, Lansky D, Dillard R, Ullmann M, Keller S, Karnes HT (2005) Bioanalytical method validation for macromolecules in support of pharmacokinetic studies. *Pharm Res*; 22(9): 1425 - 1431.
- Ward E. S., Gussow D, Griffiths A. D., Jones P. T., Winter G. (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*. Oct 12; 341(6242): 544 - 6.

35

REIVINDICACIONES

1. En un método *in vitro* para determinar la cantidad de un anticuerpo de interés incluido en una muestra biológica, dicha muestra biológica incluye además proteínas diferentes a los anticuerpos, **caracterizado porque** dicho método comprende las etapas de:
- 5 a) incubar la muestra biológica con una proteasa capaz de digerir las proteínas que no son de inmunoglobulina, pro que retienen al menos la región variable de los anticuerpos bajo condiciones apropiadas para la proteólisis de las proteínas que no son de inmunoglobulina y la digestión de las moléculas de anticuerpo para producir fragmentos de anticuerpo que contienen al menos una región CDR; y, b) determinar la cantidad de los fragmentos de anticuerpo derivados del anticuerpo de interés; dicha cantidad de fragmentos de anticuerpo correlacionada con la cantidad de anticuerpo de interés en la muestra biológica.
- 10
2. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha proteasa en la etapa a) se selecciona de entre el grupo de proteasas capaces de producir fragmentos Fab o F(ab)₂.
3. El método de la Reivindicación 2, en donde dicha proteasa en la etapa a) es pepsina o un homólogo adecuado capaz de producir fragmentos estables de F(ab)₂.
- 15
4. El método de la Reivindicación 1, 2 o 3, en donde la etapa b) comprende las siguientes subetapas de: b1) adición de uno o más péptidos como estándar interno a los fragmentos de anticuerpo generados en la etapa a), después de la desactivación de la pepsina; b2) digestión de la muestra de la etapa b1) con otra proteasa capaz de digerir proteínas que no son de inmunoglobulina, sin ser capaz de retener al menos la región variable de los anticuerpos, y opcionalmente, extraer los péptidos de la muestra; b3) separar parcialmente entre sí los péptidos extraídos en una o más muestras; b4) medir por medio de espectrometría de masas la masa o la relación de masa a carga de los péptidos de la muestra, junto con iones del fragmento seleccionado de la misma, presentes en una o más de las muestras separadas e identificar las señales de pico correspondientes a uno o más péptidos de interés del anticuerpo de interés así como los péptidos que sirven como estándar interno; y, b5) determinar la cantidad de los péptidos de interés en la muestra, determinando así la cantidad del anticuerpo interés incluida en la muestra biológica.
- 20
- 25
5. El método de la Reivindicación 4, en donde la etapa b5) consiste de la comparación de dichas señales de pico con respecto a las señales de pico derivadas de una curva estándar de anticuerpo añadido en diferentes concentraciones conocidas dentro del material fuente biológico que sirve como blanco utilizando los péptidos que sirven como estándar interno para normalización de la señal para determinar la cantidad de los péptidos de interés en la muestra, determinando así la cantidad del anticuerpo interés contenida en la muestra biológica.
- 30
6. El método de la Reivindicación 4 o 5, en donde la etapa de separación b3) se lleva a cabo por medio de la separación de los péptidos de la muestra por medio de separación cromatográfica.
7. El método de la Reivindicación 4, 5 o 6, en donde la etapa b4) de análisis por espectrometría de masas se lleva a cabo por medio de espectrometría de masas en tándem (MS/MS).
- 35
8. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 4 - 7, en donde dichos péptidos que sirven como estándar interno son péptidos marcados en forma isotópica.
9. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 8, en donde dichos péptidos de interés incluyen al menos una porción seleccionada en la región variable del anticuerpo de interés, apropiada para discriminar entre las señales de pico correspondientes específicamente a los fragmentos del anticuerpo de interés y la señal no específica correspondiente a otros fragmentos de proteína.
- 40
10. El método de la Reivindicación 9, en donde dichos péptidos de interés incluyen al menos una porción seleccionada entre aquellas que incluyen residuos aminoácidos únicos en las regiones de cadena liviana variable y/o de cadena pesada del anticuerpo cuando se compara con los correspondientes residuos aminoácidos de las IgG nativas obtenidos a partir de una base de datos de secuencia de las IgG nativas.
- 45
11. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 4 - 10, en donde dicho análisis por espectroscopia de masas se lleva a cabo utilizando un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple.
12. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 11, en donde dicha muestra biológica es un suero, plasma, tejido o línea de células derivada de cualquier especie.

13. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 12, en donde el anticuerpo de interés es un anticuerpo de origen no natural que se administra a un mamífero.

14. El método de la Reivindicación 13, en donde dicho anticuerpo de interés es un producto terapéutico potencial.

5 15. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 14, en donde dicho no tiene ninguna etapa de enriquecimiento de anticuerpo por medio de columnas de afinidad o de agotamiento de albúmina.

Figura 1

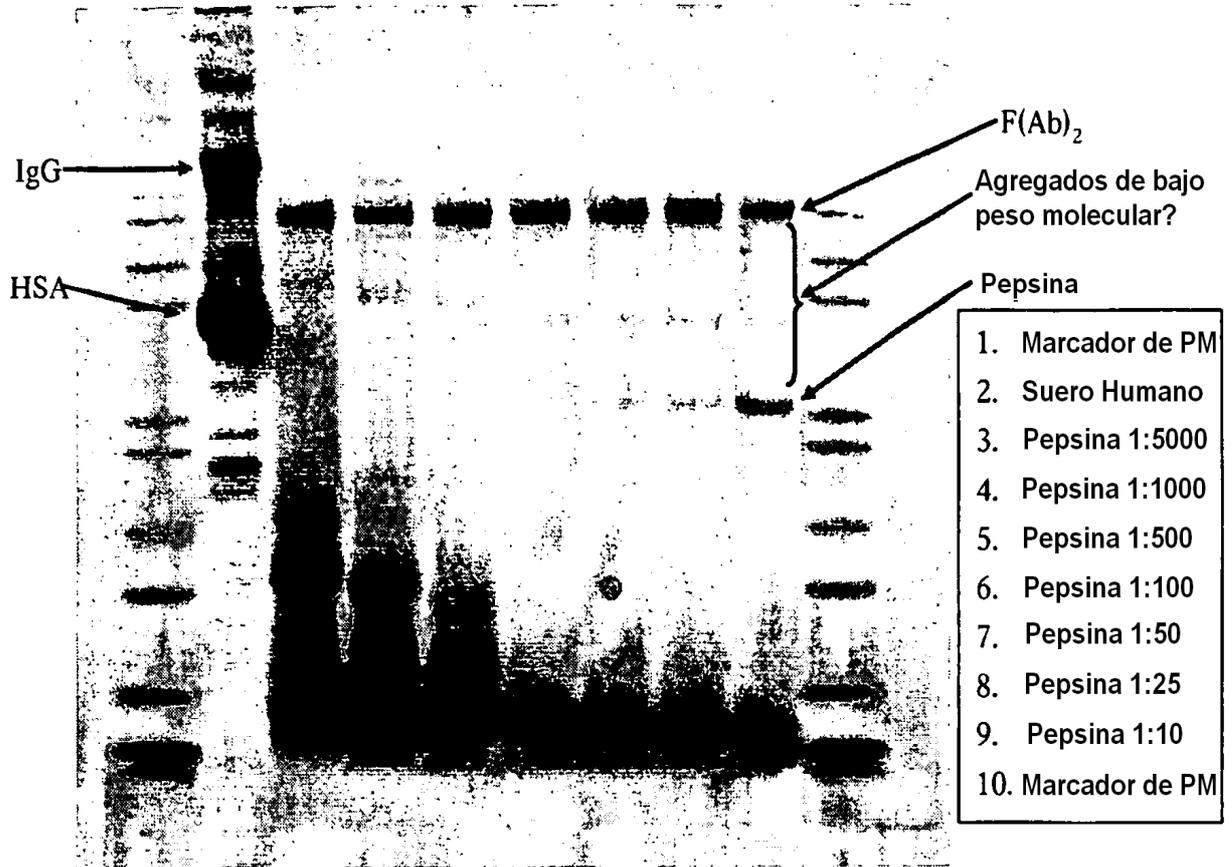


Figura 2

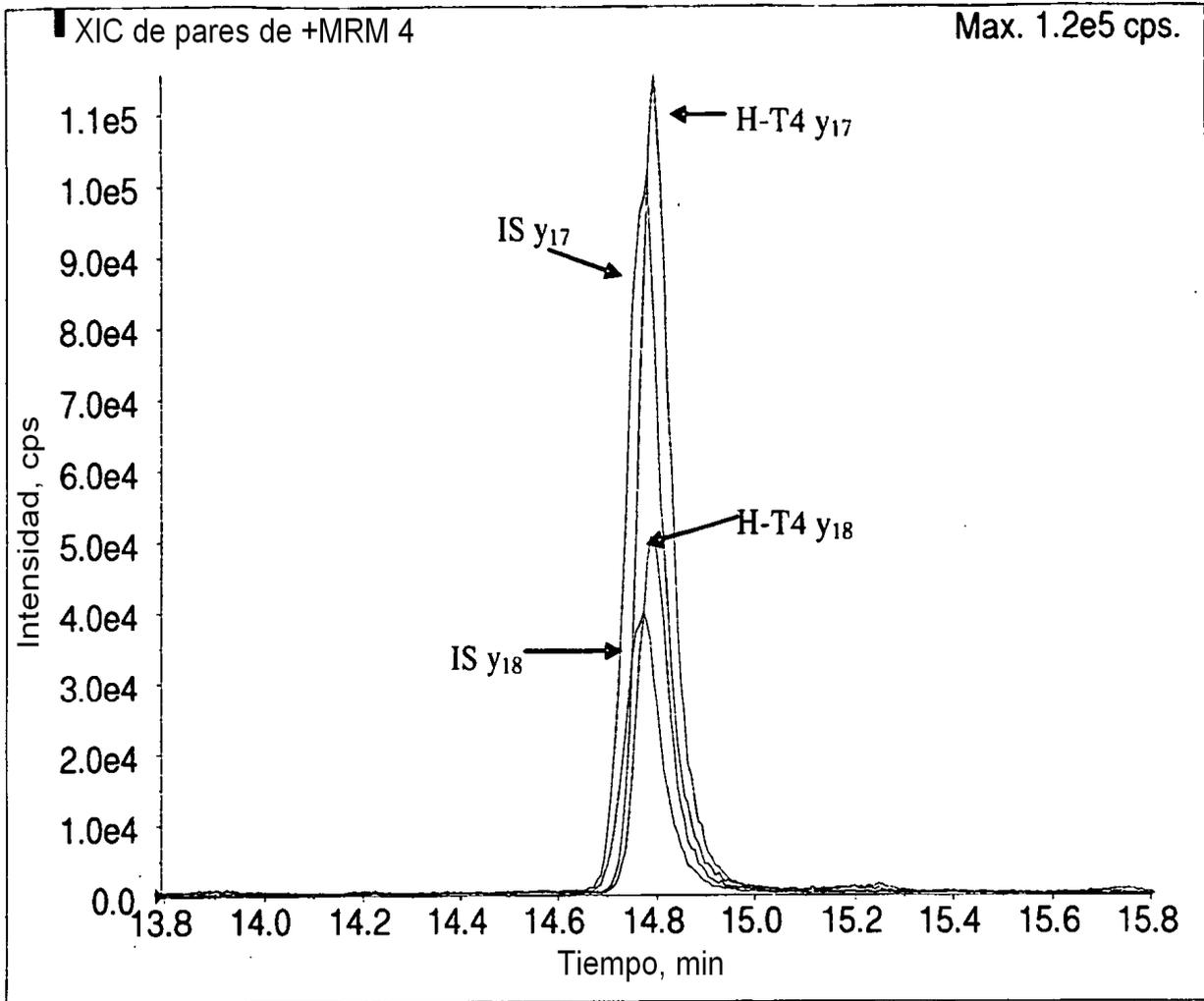


Figura 3

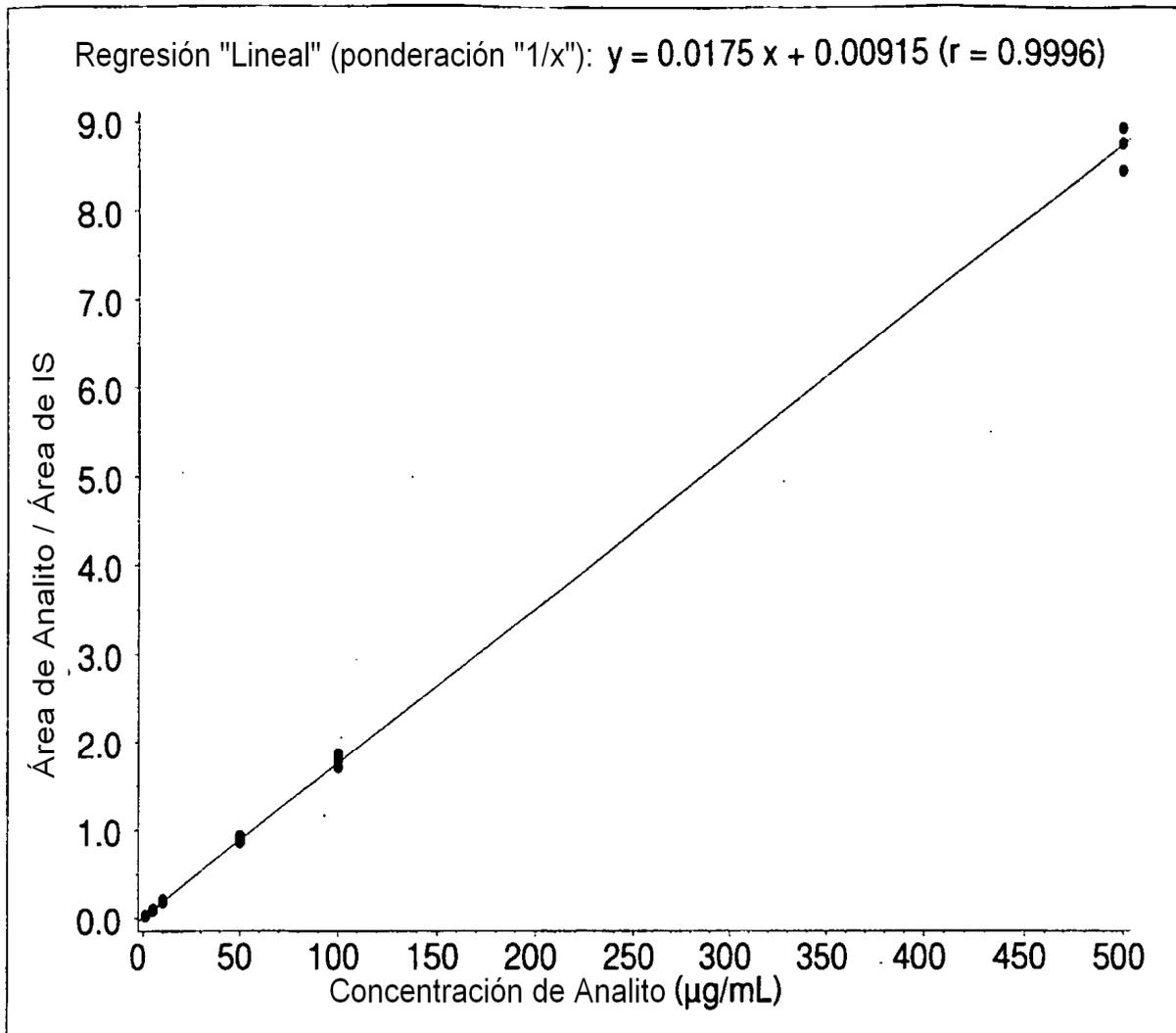


Figura 4

