

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 276**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2012 E 12722046 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2707723**

54 Título: **Método de LC-MS/MS de monitoreo de múltiples reacciones para detectar anticuerpos terapéuticos en muestras de animales usando péptidos de cambio de marco**

30 Prioridad:

12.05.2011 US 201161485249 P

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

21.04.2016

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**KAUR, SURINDER;
SAAD, OLA y
XU, KEYANG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 567 276 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de LC-MS/MS de monitoreo de múltiples reacciones para detectar anticuerpos terapéuticos en muestras de animales usando péptidos de cambio de marco

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos de detección y de determinación de la cantidad de un anticuerpo humano o humanizado de interés en una muestra de animal tal como tejido, plasma o suero. Los métodos incluyen el enriquecimiento de afinidad y la digestión con proteasas de la muestra para producir uno o más péptidos únicos y conservados para un anticuerpo humano o humanizado detectado y cuantificado mediante espectrometría de masas.

10

Antecedentes

15

El análisis de las muestras de plasma/suero generadas a partir de estudios *in vivo* de proteínas terapéuticas es de interés en la industria biofarmacéutica. La metodología ELISA convencional se ha usado durante más de 25 años, y tiene varias limitaciones. El ELISA requiere reactivos personalizados de alta calidad cuya generación puede llevar varios meses, y la optimización del ensayo, un número adicional de meses. Por lo tanto, el ELISA tiene un largo tiempo de desarrollo del ensayo, lo que es una limitación tanto en la etapa inicial del descubrimiento como en la etapa de desarrollo de fármacos basados en proteínas (Murray *et al* (2001) *J. Imm. Methods* 255: 41-56; Kirchner *et al* (2004) *Clin. Pharmacokinetics* 43(2): 83-95). En algunos casos, los reactivos para el ELISA y las condiciones de ensayo adecuados pueden no ser posibles debido a los requisitos de unión altamente personalizados para cada proteína terapéutica. Otra limitación del ELISA es que los reactivos se pueden unir de forma inespecífica con las proteínas de plasma/suero, siendo la interferencia con la matriz un fenómeno común. Por otro lado, la cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas es muy específica y, por lo tanto, la interferencia con la matriz es rara en comparación con el ELISA. El desarrollo de los ensayos de ELISA puede requerir mucha mano de obra, y reactivos complejos y específicos. El ELISA también es sensible a las interferencias de la matriz y a la reactividad cruzada de los anticuerpos. El ELISA mide la concentración de analito indirectamente usando propiedades de unión. Estas numerosas variables suponen que el desarrollo y la transferencia a otros laboratorios de métodos de ELISA de cuantificación de proteínas con un alto rendimiento supongan un reto. Basándose en estas diferencias, la espectrometría de masas es un método ortogonal al ELISA. Los métodos de espectrometría de masas de cuantificación de proteínas, en particular, LC-MS/MS, no requieren reactivos personalizados y, en general, generan un desarrollo del ensayo más rápido. Además, la espectrometría de masas está menos sujeta a las interferencias de la matriz, y proporciona condiciones de ensayo genéricas que son altamente específicas, y se pueden multiplexar y automatizar. La alta especificidad de la espectrometría de masas mide la concentración de analito usando las propiedades físico-químicas intrínsecas del analito, es decir, la masa y el patrón de fragmentación. El formato consistente permite la transferencia de un laboratorio a otro, una ventaja significativa para los tratamientos con anticuerpos autorizados. Una metodología general para la cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas es la digestión con tripsina de la proteína intacta. Los péptidos resultantes se analizan mediante espectrometría de masas introduciendo los patrones internos marcados con isótopos estables correspondientes con a una concentración fija.

20

25

30

35

40

45

50

Los recientes avances en el análisis de péptidos y proteínas mediante espectrometría de masas (MS) se deben a los desarrollos en las técnicas de introducción e ionización en fase gaseosa frontal tales como ionización por electronebulización (ESI) y desorción e ionización por láser asistida por matriz (MALDI, documento US 2003/0027216), así como mejoras en la sensibilidad instrumental, la resolución, la precisión en masa, la bioinformática y los algoritmos de desconvolución de los datos de programas informáticos ("Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications", Cole, R. B., Ed. (1997) Wiley, Nueva York; "Modern Protein Chemistry: Practical Aspects", Howard, G. C. y Brown, W. E., Eds. (2002) CRC Press, Boca Raton, FL, p. 71-102; Martin *et al* (1997) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40:189-201; documento WO 03/046571; documento WO 03/046572).

55

60

La espectrometría de masas en tándem con la cromatografía de líquidos es una potente herramienta para el análisis de proteínas y la cuantificación en matrices muy complejas como las muestras de plasma/suero. Dado que los péptidos resultantes de la digestión de la proteína de interés y otras proteínas plasmáticas/séricas pueden tener una masa nominal igual o similar, la segunda dimensión de la fragmentación de MS a menudo proporciona un fragmento único de un péptido de interés. La combinación del péptido parental específico y el ión del fragmento único se usa para controlar selectivamente la molécula que se va a cuantificar. Esta metodología se denomina "monitoreo de reacciones múltiples" (MRM), también conocida como monitoreo selectivo de reacción (SRM), que es un modo de uso común para la cuantificación de proteínas.

65

La ionización por electronebulización (ESI) proporciona la ionización a presión atmosférica (API) de una muestra de líquido. El proceso de electronebulización crea gotitas altamente cargadas que, al evaporarse, crean iones representativos de las especies contenidas en la solución. Se puede usar un orificio de muestreo de iones de un espectrómetro de masas para muestrear estos iones en fase gaseosa para el análisis de masas. La respuesta para

un analito medido por el detector de espectrómetro de masas depende de la concentración del analito en el líquido y es independiente del caudal del líquido.

5 La publicación PCT WO 2011/042027 describe un método de cuantificación de proteínas recombinantes individuales de una mezcla mediante la detección de péptidos únicos usando espectrometría de masas.

Sumario

10 La invención proporciona un método de detección de anticuerpos humanos o humanizados que comprende las etapas de:

(a) tratar una muestra biológica con una enzima digestiva para formar una muestra de anticuerpo digerida, en el que la muestra biológica es suero, plasma, tejido o células de un animal que ha sido tratado con un anticuerpo humano o humanizado; y

15 (b) analizar la muestra de anticuerpo digerida por espectrometría de masas para detectar uno o más péptidos presentes en los anticuerpos humanos y no presentes en los anticuerpos animales, en el que los péptidos comprenden una o más secuencias seleccionadas entre SEQ ID NO: 1-8,

20 en el que la enzima digestiva es tripsina.

En una realización ilustrativa, la muestra biológica se pone en contacto con un adsorbente de medios de captura por afinidad o de cromatografía. Una muestra biológica enriquecida se eluye después tratada con la enzima digestiva.

25 En una realización ilustrativa, se mide la concentración de muestra de anticuerpo digerida.

Un aspecto de la invención son métodos de digestión con proteasa de la muestra o de la captura de inmunofinidad seguida de la digestión de la proteasa para producir uno o más péptidos únicos para un anticuerpo humano o humanizado, es decir, que no están presentes en muestras biológicas de origen animal, detectados y cuantificados por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

30 Una realización de la invención es anticuerpos humanos o humanizados conjugados con restos farmacológicos en la que los conjugados de anticuerpo-fármaco se miden mediante los métodos de la invención.

Breve descripción de las figuras

35 La Figura 1 muestra la alineación de secuencias de aminoácidos de cadena pesada de un anticuerpo humano 2H7 ocrelizumab, Hu2H7 (SEQ ID NO: 11), que comienza en el resto 101, y cinco anticuerpos anti-CD20 de mono cynomolgus: CynoHC 1a D3 1 (SEQ ID NO: 12), CynoHC 1b E5 1 (SEQ ID NO: 13), Cyno HC 2a (SEQ ID NO: 14), CynoHC 2b E6 1 (SEQ ID NO: 15), CynoHC 3 (SEQ ID NO: 16). Los péptidos de cambio de marco se identifican (FSP 1-8) como los subrayados que son únicos para el Mab 2H7 humano (hu 2H7) y no están presentes en la cadena pesada de IgG de mono cynomolgus, portando cada uno al menos una diferencia de aminoácido en las secuencias.

40 La Figura 2 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 17) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 18) de trastuzumab (Herceptin®, Genentech Inc.; rhuMAbHER2, Anti p185HER2), un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante derivado, n.º registro CAS 180288-69- 1.

45 La Figura 3 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 11) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 19) de ocrelizumab, rhuMAb 2H7, PRO70769, un anticuerpo anti-CD20 humanizado, n.º registro CAS 637334-45-3.

50 La Figura 4 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 20) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 21) de pertuzumab, rhuMAb 2C4, n.º registro CAS 380610-27-5. FSP2, FSP3, FSP8 se identifican como los subrayados en la cadena pesada (SEQ ID NO: 20).

La Figura 5 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 22) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 23) de anti-PDL1, miembro de la familia ampliada de CD28/CTLA-4 de los reguladores de los linfocitos T. FSP2, FSP4, FSP8 se identifican como los subrayados en la cadena pesada (SEQ ID NO: 22).

55 La Figura 6 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 24) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 25) de anti-neuropilina-1, anti-NRP1, MNRP1685A. FSP2, FSP4, FSP8 se identifican como los subrayados en la cadena pesada (SEQ ID NO: 24).

La Figura 7 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 26) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 27) de anti-MUC16, MMUC3333A/DMUC4064A. FSP2, FSP4, FSP8 se identifican como los subrayados en la cadena pesada (SEQ ID NO: 26).

60 Figura 8 muestra la (SEQ ID NO: 28) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 29) de rituximab, C2B8, MabThera, (Rituxan®, Genentech Inc., Biogen/Idec), n.º registro CAS 174722-31-7. FSP2, FSP4, FSP8 se identifican como los subrayados en la cadena pesada (SEQ ID NO: 28).

La Figura 9 muestra las etapas genéricas para el método LC-MS/MS para cuantificar un anticuerpo terapéutico en plasma/suero de animal usando uno o más péptidos de cambio de marco (FSP).

65 La Figura 10 muestra el monitoreo de múltiples reacciones de trastuzumab digerido por la tripsina. Los péptidos de cambio de marco FSP3 (12,5 minutos), FSP8 (15 minutos) y FSP5 (17 minutos) se separan y se cuantifican

inicialmente.

La Figura 11 muestra el espectro de MS/MS de FSP5 del conjugado de anticuerpo-fármaco anti-MUC16 capturado por afinidad y luego digerido que se había añadido al plasma.

La Figura 12 muestra una curva de calibración de FSP8 añadido a diversas concentraciones de 1 a 1.000 µg/ml en plasma de mono Cynomolgus heparinizado con litio preparado mediante la metodología de SPE/digestión de plasma entero.

La Figura 13 muestra cromatogramas de LC-MS/MS que demuestran la detección de FSP8 añadido a plasma de mono Cynomolgus heparinizado con litio a LLOQ = 1 µg/ml tras la preparación de muestras SPE/digestión de plasma entero.

La Figura 14 muestra un diagrama de flujo de las etapas para el método de LC-MS/MS con captura de afinidad de la digestión terapéutica y enzimática de proteínas para generar péptidos de cambio de marco (FSP) de mAb en plasma/suero de animal.

La Figura 15 muestra un dibujo de la captura de mAb a partir de plasma/suero de animal sobre perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina unidas a una sonda de captura biotilada o perla magnética recubierta de proteína A, G, seguido del aislamiento por separación magnética, digestión del anticuerpo capturado y análisis por LC-MS/MS.

La Figura 16 muestra realizaciones de la perla magnética recubierta con Proteína A, G (parte superior) para la captura genérica de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina y anticuerpo unidas a una sonda de captura biotilada (parte inferior) para la captura específica del anticuerpo.

La Figura 17a muestra la separación y detección por LC-MS/MS de FSP8 a 1 µg/ml de anticuerpo trastuzumab en plasma de rata.

La Figura 17b muestra la separación y detección por LC-MS/MS de patrón interno FSP8 marcado con isótopos estables (SIL).

La Figura 18 muestra la linealidad de la detección, la representación de la proparte de FSP8 con respecto al patrón interno FSP8 marcado con isótopos estables frente a la concentración de trastuzumab (HERCEPTIN®) de 1-250 µg/ml en plasma de rata.

La Figura 19a muestra un dibujo del anticuerpo monoclonal (mAb terapéutico) capturado mediante la unión a un dominio extracelular inmovilizado (ECD) o anticuerpo policlonal anti-IgG humana y detectado con un anticuerpo policlonal anti-IgG humana marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en un ensayo de ELISA con detección electroquimioluminiscente o colorimétrico.

La Figura 19b muestra los elementos del ensayo de LC-MS/MS a partir de la captura con la proteína A de un mAb terapéutico de una muestra biológica, la digestión con tripsina del mAb terapéutico capturado para formar uno o más péptidos de cambio de marco (FSP), por ejemplo, FSP8, y detección mediante LC/MS/MS de monitoreo de múltiples reacciones (MRM) para detectar la transición de 938,0 (M, 2+) a 836,7 (y15, 2+).

La Figura 20 muestra la concordancia entre el ensayo de LC-MS/MS mostrado en la Figura 19b y el ensayo de ELISA de la Figura 19a basado en la farmacocinética (PK) individual de las muestras de plasma/suero de ratas que recibieron trastuzumab, un mAb anti-HER2.

La Figura 21 muestra la concordancia entre el ensayo de LC-MS/MS mostrado en la Figura 19b y el ensayo de ELISA de la Figura 19a basado en la farmacocinética (PK) individual de las muestras de plasma/suero de ratas que recibieron 3A5, un mAb anti-MUC 16.

La Figura 22 muestra la concordancia entre el ensayo de LC-MS/MS mostrado en la Figura 19b y el ensayo de ELISA de la Figura 19a basado en la farmacocinética (PK) individual de las muestras de plasma/suero de las ratas que recibieron un mAb anti-mesotelina (Msln).

La Figura 23 muestra la concordancia entre el ensayo de LC-MS/MS mostrado en la Figura 19b y el ensayo de ELISA de la Figura 19a basado en la farmacocinética (PK) media de las muestras de plasma/suero de mono cynomolgus que recibieron 3A5 (MMUC1206A), un mAb anti-MUC 16 mediante la medición de anticuerpo en el plasma durante 28 días.

La Figura 24 muestra la concordancia entre el ensayo de LC-MS/MS mostrado en la Figura 19b y el ensayo de ELISA de la Figura 19a basado en la farmacocinética (PK) media de las muestras de plasma/suero de mono cynomolgus que recibió un mAb anti-mesotelina (Msln) mediante la medición de anticuerpos en el plasma durante 40 días.

La Figura 25 muestra la concordancia entre el ensayo de LC-MS/MS mostrado en la Figura 19b y el ensayo de ELISA de la Figura 19a basado en la farmacocinética (PK) individual de las muestras de plasma/suero de ratones (A, B, C) que recibieron un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), anti-LY6E-MC-vc-PAB-MMAE, en estudios de eficacia con ratones.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención, y coinciden con: Singleton *et al*, (1994) "Dictionary of Microbiology and Molecular Biology", 2ª Ed., J. Wiley & Sons, Nueva York, NY; y Janeway, *et al* (2001) "Immunobiology", 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York. Cuando, en el presente documento, se usan nombres comerciales, también se incluyen la formulación del producto del nombre comercial, el fármaco genérico y el/los principio/s farmacéutico/s activo/s del producto del nombre comercial.

Definiciones

La expresión "muestra biológica" es cualquier componente derivado o separado de un animal, e incluye sangre, plasma, suero, células, orina, líquido cefalorraquídeo (CSF), leche, lavado bronquial, médula ósea, líquido amniótico, saliva, bilis, vítreo, lágrimas o tejido.

La expresión "enzima digestiva" es una enzima capaz de escindir o hidrolizar péptidos o proteínas en fragmentos de una manera aleatoria bien específica o genérica. Una enzima digestiva puede formar una muestra de anticuerpo digerida de un anticuerpo, siendo el anticuerpo un componente de una muestra biológica. Las enzimas digestivas incluyen proteasas tales como tripsina, papaína, endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, estafilococo *aureus* V8, quimotripsina, Asp-N, Asn-C, pepsina y endoproteinasa GluC.

El término "anticuerpo", en el presente documento, se usa en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad de unión al antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos que se describen a continuación. Para una revisión de algunos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al. Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pág. 269-315 (1994); documento WO 93/16185; documento US 5571894; documento US 5587458. Para una descripción de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden restos de epítomos de unión al receptor de rescate y que tienen un aumento de la semivida *in vivo*, véase el documento US 5869046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos (documento EP 404097; documento WO 1993/01161; Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134; Hollinger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:6444-6448). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una parte del dominio variable de cadena pesada, o todo o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (documento US 6248516).

Los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por las células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

La expresión anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una determinada fuente o especie, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La expresión "región Fc", en el presente documento, se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. La expresión incluye las regiones Fc de la secuencia nativa y las regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no presente. A menos que se especifique lo contrario, en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, también denominado índice de la UE, como se describe en Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Región marco" o "FR" se refiere a los restos del dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable, en general, consiste en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR, en general, aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Las expresiones “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo entero” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se ha definido en el presente documento.

Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana, o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos. Dicha definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno no humanos.

Un “marco de consenso humano” es una región marco de un anticuerpo que representa los restos de aminoácido más comunes de una selección de secuencias marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Por lo general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como el de Kabat *et al.*, “Sequences of proteins of Immunological Interest”, quinta edición, Publicación del NIH, 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En el presente documento, el subgrupo que se describe es el subgrupo kappa I de Kabat *et al.*, *supra*. También se describe en el presente documento, para VH, el subgrupo III de Kabat *et al.*, *supra*.

Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácido de HVR no humanas y restos de aminoácido de FR humanas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a la humanización.

Un anticuerpo “quimérico” comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana (documento US 4816567; Morrison *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81:6851-6855). En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo “cambiado de clase”, en el que se ha cambiado la clase o la subclase de la de un anticuerpo parental. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Por lo general, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad hacia los seres humanos, conservando a la vez la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano parental. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o partes de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o partes de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos restos de FR de un anticuerpo humanizado se sustituyen con los restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los restos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos de fabricación de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen además en, por ejemplo, Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 86:10029-10033 (1989); documento US 5821337; documento US 7527791; documento US 6982321; documento US 7087409; Kashmiri *et al.* (2005) “Methods” 36:25-34 (que describen el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498 (que describe el “resurgimiento”); Dall'Acqua *et al.* (2005) “Methods” 36:43-60 (que describen la “transposición de FR”); y Osbourn *et al.* (2005) “Methods” 36:61-68; Klimka *et al.* (2000) *Br. J. Cancer* 83:252-260 (que describen la metodología de “selección guiada” para la transposición de FR).

Las regiones marco humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero sin limitación: regiones marco seleccionadas usando el método de “mejor ajuste” (véase, por ejemplo, Sims *et al. J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un determinado subgrupo de regiones variables de cadena ligera o pesada (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623); regiones marco maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones marco humanas de la línea germinal (Almagro y Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633); y regiones marco derivadas de la exploración de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; y Rosok *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618).

Los anticuerpos humanos pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en Van Dijk y van de Winkel, (2001) *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74; Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20: 450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta al desafío antigénico. Dichos animales normalmente contienen todos o una parte de los loci de inmunoglobulina humana, que reemplazan los loci de inmunoglobulina endógenos, o que están presentes extracromosómicamente o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los loci de inmunoglobulina endógenos, en general, se han inactivado. Para revisar los métodos de obtención de anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véase también, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSE™; el documento US 5770429, que describe la tecnología HUMAB®; el documento US 7041870, que describe la tecnología K-M MOUSE® y el documento US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCITY-MOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante la combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también se pueden crear mediante métodos basados en el hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-ser humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, (1991) *J. Immunol.*, 147: 86). También se describen anticuerpos humanos generados mediante la tecnología del hibridoma de linfocitos B humano en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 103:3557-3562 (2006). Otros métodos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma); Ni, (2006) Xiandai Mianyixue, 26 (4): 265-268 (que describen hibridomas humano-humano). La tecnología del hibridoma humano (tecnología del trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, (2005) "Histology and Histopathology", 20(3):927-937, y Vollmers y Brandlein, (2005) "Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology", 27(3):185-91.

Los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante el aislamiento de secuencias de dominio variable de clones Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación de fagos derivados de seres humanos. A continuación, se pueden combinar dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para la selección de anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de anticuerpos se describen más adelante. Los anticuerpos usados en los métodos de la invención se pueden aislar mediante la exploración de bibliotecas combinatorias en busca de anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conoce varios métodos en la técnica para generar bibliotecas de presentación de fagos y explorar dichas bibliotecas en busca de anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en Hoogenboom *et al.* en "Methods in Molecular Biology" 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597; Marks y Bradbury, en "Methods in Molecular Biology" 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310; Lee *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093; Fellouse, (2004) *Pro. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101(34): 12467-12472; y Lee *et al.* (2004) *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132.

En ciertos métodos de presentación de fagos, los repertorios de genes VH y VL se clonan por separado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que luego se pueden explorar en busca de fagos de unión al antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Los fagos normalmente muestran fragmentos de anticuerpos, ya sea fragmentos Fv monocatenario (scFv) o fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio no tratado previamente se puede clonar (por ejemplo, de ser humano) para proporcionar una sola fuente de anticuerpos para una amplia selección de antígenos no propios y también autoantígenos sin ninguna inmunización según lo descrito por Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Por último, también se pueden crear bibliotecas no tratadas previamente de manera sintética mediante la clonación de segmentos de genes V no reordenados de células madre, y el uso de cebadores de PCR que contienen la secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para realizar el reordenamiento *in vitro*, según lo descrito por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las bibliotecas de fagos de anticuerpos humanos se describen en los documentos US 5 5750373; US 2005/0079574; US 2005/0119455; US 2005/0266000; US 2007/0117126; US 2007/0160598; US 2007/0237764; US 2007/0292936; US 2009/0002360. En el presente documento, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es por un antígeno, y la otra es por un segundo antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes del mismo antígeno. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos en células que expresen un antígeno. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas de fabricación de anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), documento WO 93/08829, y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y el diseño de "botón en ojal" (documento US 5731168). También se pueden crear anticuerpos multiespecíficos mediante el diseño de efectos de dirección electrostáticos para la fabricación de moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpos (documento WO 2009/089004A1); la reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.676.980, y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); el uso de cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); el uso de la tecnología de "diacuerpos" para crear fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90: 6444- 6448 (1993)); y el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv) (Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)); y la preparación de anticuerpos trispecíficos (Tutt *et al.* (1991) *J. Immunol* 147: 60).

En el presente documento, también se incluyen los anticuerpos modificados con tres o más sitios de unión al antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos de pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento del presente documento también incluye un "Fab de acción doble" o "DAF", que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno, así como otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

Variantes de anticuerpo

En ciertas realizaciones, se contemplan las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede preparar cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para obtenerse la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, la unión al antígeno.

Los anticuerpos incluyen proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo y una proteína, resto farmacológico, marcador o algún otro grupo. Las proteínas de fusión se pueden preparar mediante técnicas recombinantes, conjugación o síntesis de péptidos, para optimizar las propiedades tales como la farmacocinética. El anticuerpo humano o humanizado también puede ser una proteína de fusión que comprenda una secuencia de péptido de unión a la albúmina (ABP) (Dennis *et al.* (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" *J Biol Chem.* 277:35035-35043; documento WO 01/45746). Las proteínas de fusión con secuencias de ABP se describen en (i) Dennis *et al* (2002) *J Biol Chem.* 277:35035-35043, en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) documento US 2004/0001827, en [0076]; y (iii) documento WO 01/45746, en las páginas 12-13.

Variantes de sustitución, inserción y eliminación

En ciertas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1, con el título "sustituciones conservadoras". En la Tabla 1, se proporcionan más cambios sustanciales, con el título "sustituciones ilustrativas", y como se describe posteriormente en referencia a las clases monocatenarias de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir en un anticuerpo de interés y rastrear los productos en busca de una actividad deseada, por ejemplo, de la unión al antígeno conservada/mejorada, la reducción de la inmunogenicidad, o la ADCC o CDC mejoradas.

Tabla 1

Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp

Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 5 (1) hidrófobo: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácido: Asp, Glu;
- (4) básico: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- 10 (6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

15 Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la/s variante/s resultante/s seleccionada/s para el estudio adicional tendrá/n modificaciones (por ejemplo, mejoras) en ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, aumento de la afinidad, reducción de la inmunogenicidad) en relación con el anticuerpo parental y/o tendrá/n sustancialmente conservadas ciertas propiedades biológicas del anticuerpo parental. Una variante de sustitución ilustrativa es un anticuerpo de afinidad madurada, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en la presentación de fagos tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más restos de HVR, y se presentan las variantes de anticuerpos en fagos y se rastrean en busca de una determinada actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión).

25 Las modificaciones (por ejemplo, las sustituciones) se pueden hacer en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas modificaciones se pueden hacer en "puntos calientes" de HVR, es decir, restos codificados por codones que se someten a mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), ensayándose la variante resultante VH o VL para determinar la afinidad de unión. La maduración de la afinidad mediante la construcción y la reselección a partir de bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en "Methods in Molecular Biology" 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas realizaciones de la maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para la maduración mediante cualquiera de varios métodos (por ejemplo, PCR propensa a error, transposición de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una biblioteca secundaria. La biblioteca se rastrea entonces para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método de introducción de diversidad implica metodologías dirigidas a HVR, en las que se asignan al azar varios restos de HVR (por ejemplo, 4-6 restos a la vez). Los restos de HVR implicados en la unión al antígeno se pueden identificar específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis por barrido de alanina o modelización. En particular, CDR-H3 y CDR-L3, suelen ser dianas.

40 En ciertas realizaciones, se pueden producir sustituciones, inserciones o eliminaciones en una o más HVR siempre y cuando dichas modificaciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, en las HVR, se pueden realizar modificaciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras conforme a lo dispuesto en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Dichas modificaciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de HVR o SDR. En ciertas realizaciones de las variantes

de secuencias de VH y VL proporcionadas anteriormente, cada HVR bien permanece invariable o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácido.

5 Un método útil de identificación de los restos o de las regiones de un anticuerpo que pueden ser dianas de la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" según lo descrito por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. En dicho método, un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa, o además, una estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos pueden ser dianas o eliminarse como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden explorar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

15 Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxi-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión por los extremos N- o C-terminal del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Variantes de glicosilación

25 Un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo está glicosilado. La adición o eliminación de sitios de glicosilación en un anticuerpo se puede realizar convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o se eliminan uno o más sitios de glicosilación.

30 Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede modificar el hidrato de carbono unido a la misma. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero normalmente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenarico, que está generalmente unido por un enlace N con Asn297 del dominio CH2 de la región Fc (Wright *et al.* (1997) TIBTECH 15:26-32). El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil-glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el "tronco" de la estructura de oligosacárido biantenarico. Como se describe en el presente documento, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo con el fin de crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

40 En una realización descrita en el presente documento, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de hidrato de carbono que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa de dicho anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad media de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y ricas en manosa), medida por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de asparagina situado en aproximadamente la posición 297 de la región Fc (numeración Eu de restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también se puede situar aproximadamente ± 3 aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de la secuencia en los anticuerpos de menor importancia. Dichas variantes de fucosilación pueden tener mejor función de ADCC (documentos US 2003/0157108; US 2004/0093621). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con las variantes de anticuerpos "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: documento US 2003/0157108; documento US 2000/61739; documento WO 2001/29246; documento US 2003/0115614; documento US 2002/0164328; documento US 2004/0093621; documento US 2004/0132140; documento US 2004/0110704; documento US 2004/0110282; documento US 2004/0109865; documento WO 2003/085119; documento WO 2003/084570; documento WO 2005/035586; documento WO 2005/035778; documento WO2005/053742; documento WO2002/031140; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotech. Bioeng.* 87:614. Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); documento US 2003/0157108, Presta, L; y documento WO 2004/056312, Adams *et al.*, especialmente, en el Ejemplo 11), y líneas celulares desactivadas tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO desactivadas (Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotech. Bioeng.* 87:614; Kanda, Y. *et al.* (2006) *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688; documento WO2003/085107).

65 Además, se proporcionan variantes de anticuerpos con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo está biseccionado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener menor fucosilación y/o mayor función de ADCC. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); patente de EE.UU. n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de

anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden haber mejorado la función de CDC. Dichas variantes de anticuerpos se describen (documento WO 1997/30087; documento WO 1998/58964; documento WO 1999/22764).

5 Variantes de la región Fc

Se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que comprenda una modificación de aminoácidos, (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En el presente documento, se describe una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que lo convierten en un candidato deseable para las aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* sea importante aunque ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) sean innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (careciendo, por tanto, probablemente de actividad de ADCC), pero que mantenga la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, los linfocitos NK, solamente expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991). En el documento US 5500362; Hellstrom, I. *et al.* (1986) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 83:7059-7063; Hellstrom, I *et al.* (1985) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 82:1499-1502; documento US 5821337; Bruggemann, M. *et al.* (1987) *J. Exp. Med.* 166:1351-1361, se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés. Como alternativa, se pueden emplear métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo no radiactivo de la citotoxicidad ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo no radiactivo de la citotoxicidad CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o además, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* (1998) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 95: 652-656. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por lo tanto, que carece de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, el ELISA de unión a C1q y C3c del documento WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (Gazzano-Santoro *et al.* (1996), *J. Immunol. Methods* 202:163; Cragg, M. S. *et al.* (2003) *Blood* 101:1045-1052; Cragg, M. S. y M. J. Glennie, (2004) *Blood* 103:2738-2743). También se pueden realizar determinaciones de unión a FcRn y de eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (Petkova, S. B. *et al.* (2006) *Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769).

Los anticuerpos con la función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (documento US 6737056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante de Fc "DANA" con la sustitución de los restos 265 y 297 en alanina (documento US 7332581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con una mayor o menor unión a FcR. (documento US 6737056; documento WO 2004/056312; Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración de restos de UE).

En algunas realizaciones, se realizan modificaciones en la región Fc que dan lugar a la modificación (es decir, aumento o reducción) de la unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.194.551, documento WO 99/51642 e Idusogie *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164: 4178-4184.

Los anticuerpos con mayores semividas y mejor unión al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del resto 434 de la región Fc (patente de EE.UU. n.º 7.371.826). Véanse también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); documento US 5648260; documento US 5624821; y documento WO 94/29351 relativos a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

Variantes de anticuerpos de cisteína diseñados

En ciertas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos de cisteína diseñados, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyan con restos de cisteína. En determinadas realizaciones, los restos sustituidos se producen en los sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de aquellos restos con cisteína, de colocan, de este modo, grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo, y se pueden usar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármaco o restos de enlazador-fármaco, para crear un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), también denominado inmunocombinado, como se describe además en el presente documento. En ciertas realizaciones, se pueden sustituir uno o más de los siguientes restos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de la UE) de la cadena pesada; y S400 (numeración de la UE) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos diseñados con cisteína se pueden generar como se describe, por ejemplo, en el documento US 7521541.

Derivados de anticuerpos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar más para que contenga restos no proteicos adicionales que sean conocidos en la técnica y se puedan obtener fácilmente. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de anhídrido de etileno/maleico, poliaminoácidos (bien homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil-pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si hay más de un polímero unido, pueden ser las mismas o diferentes moléculas. En general, el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se van a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteico que se pueden calentar de forma selectiva mediante la exposición a la radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 102:11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero sin limitación, las longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la que se destruyen las células próximas al anticuerpo-resto no proteico.

La expresión "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos de cuatro cadenas naturales comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR generalmente comprenden restos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), siendo estas últimas de mayor variabilidad de la secuencia y/o estando implicadas en el reconocimiento de los antígenos. Los bucles hipervariables ilustrativos se producen en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Las CDR ilustrativas (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los restos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3 (Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). A excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los restos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "restos determinantes de la especificidad" o "SDR", que son restos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de las regiones CDR denominadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR ilustrativas (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los restos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3 (Almagro y Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633). A menos que se indique lo contrario, los restos de HVR y otros restos del dominio variable (por ejemplo, restos FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al. supra*.

Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica hasta más del 95 % o 99 % de pureza determinada mediante, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para la revisión de los métodos de evaluación de la pureza de anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.* (2007) *J. Chromatogr. B* 848:79-87.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que

comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, a excepción de posibles variantes de anticuerpos, por ejemplo, que contienen mutaciones que se producen de forma natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando, en general, dichas variantes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante en un antígeno. De este modo, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante algún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante varias técnicas, incluyendo, pero sin limitación, el procedimiento del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulina humana, estando dichos métodos y otros métodos ilustrativos de preparación de anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento.

Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) ni radiomarcador. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

"Anticuerpos naturales" se refiere a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con diferentes estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que son enlaces de disulfuro. Del extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada un dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). Del mismo modo, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada un dominio ligero variable o un dominio variable de cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos de la secuencia polipeptídica de referencia, tras la alineación de las secuencias y la introducción de los huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversas maneras que pertenecen al alcance de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible para el público en general, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para la alineación de secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE.UU., Washington DC, 20559, donde se encuentra registrado con el n.º de registro de los derechos de autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 se encuentra a disposición del público en general en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, como alternativa, puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y, donde X es el número de restos de aminoácidos marcados como correspondencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos de B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con A. A menos que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural generalmente tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* "Kuby Immunology", VI ed., W. H. Freeman y Co., pág. 91 (2007). Un solo dominio VH o VL puede bastar para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un determinado antígeno se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se una al antígeno para

rastrear una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente (Portolano *et al.* (1993) *J. Immunol.* 150:880-887; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628).

Los "antígenos asociados a tumores" (TAA) son conocidos en la técnica, y se pueden preparar para su uso en la generación de anticuerpos humanos o humanizados usando métodos e información que son bien conocidos en la técnica. En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana o polipéptidos asociados de otro modo a los tumores que se expresen específicamente en la superficie de uno o más tipo/s determinado/s de células de cáncer en comparación con una o más células normales no cancerosas. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antígenos de la superficie celular asociados a tumores ha dado lugar a la capacidad de dirigirse específicamente a las células cancerosas para la su destrucción a través de tratamientos basados en anticuerpos.

Los ejemplos de TAA incluyen, pero sin limitación, los TAA (1)-(36) enumerados a continuación. Por conveniencia, a continuación, se presenta la información relativa a estos antígenos, todos ellos conocidos en la técnica, e incluye nombres, nombres alternativos, números de acceso del GenBank y de referencia primarios, siguiendo las convenciones de identificación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias de ácido nucleico y proteínas que corresponden a los TAA (1)-(36) se encuentran disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank. Los antígenos asociados a tumores dirigidos por anticuerpos incluyen todas las variantes de secuencias de aminoácidos e isoformas que poseen al menos aproximadamente el 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con respecto a las secuencias identificadas en las referencias citadas, o que presentan sustancialmente las mismas propiedades o características biológicas que un TAA que tenga una secuencia que se encuentre en las referencias citadas. Por ejemplo, un TAA que tenga una secuencia de variante, en general, es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo que se una específicamente al TAA con la secuencia correspondiente en la lista.

ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES (1)-(36):

(1) BMPR1B (receptor de proteínas morfogenéticas óseas de tipo IB, n.º de acceso del Genbank NM_001203) ten Dijke, P., *et al.*, *Science* 264 (5155):101-104 (1994), *Oncogene* 14 (11):1377-1382 (1997); documento WO2004/063362 (Reivindicación 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/134790-A1 (pág. 38-39); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; pág. 296); documento WO2003/055443 (pág. 91-92); documento WO2002/99122 (Ejemplo 2; pág. 528-530); documento WO2003/029421 (Reivindicación 6); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig. 112); documento WO2002/98358 (Reivindicación 1; pág. 183); documento WO2002/54940 (pág. 100-101); documento WO2002/59377 (pág. 349-350); documento WO2002/30268 (Reivindicación 27; pág. 376); documento WO2001/48204 (Ejemplo; Fig. 4); receptor de proteínas morfogenéticas óseas de tipo IB NP_001194/pid=NP_001194.1. Referencias cruzadas: MIM: 603248; NP_001194.1; AY065994.

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, n.º de acceso del Genbank NM_003486) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 (2), 283-288 (1999), *Nature* 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H. W., *et al* (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (16):11267-11273; documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento WO2002/99074 (Reivindicación 19; pág. 127-129); documento WO2002/86443 (Reivindicación 27; pág. 222, 393); documento WO2003/003906 (Reivindicación 10; pág. 293); documento WO2002/64798 (Reivindicación 33; pág. 93-95); documento WO2000/14228 (Reivindicación 5; pág. 133-136); documento US2003/224454 (Fig. 3); documento WO2003/025138 (Reivindicación 12; pág. 150); 7 de la familia de vehículos de solutos NP_003477 (transportador de aminoácidos catiónicos, y+system), miembro 5/pid=NP_003477.3 - *Homo sapiens*; Referencias cruzadas: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1.

(3) STEAP1 (antígeno prostático epitelial de transmembrana de seis hélices, n.º de acceso del Genbank NM_012449); *Cancer Res.* 61(15), 5857-5860 (2001), Hubert, R. S., *et al* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96 (25):14523-14528; documento WO2004/065577 (Reivindicación 6); documento WO2004/027049 (Fig. 1L); EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2004/016225 (Reivindicación 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/157089 (Ejemplo 5); documento US2003/185830 (Ejemplo 5); documento US2003/064397 (Fig. 2); documento WO2002/89747 (Ejemplo 5; pág. 618-619); documento WO2003/022995 (Ejemplo 9; Fig. 13A, Ejemplo 53; pág. 173, Ejemplo 2; Fig. 2A); antígeno prostático epitelial de transmembrana de seis hélices NP_036581; Referencias cruzadas: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1.

(4) 0772P (CA125, MUC16, n.º de acceso del Genbank AF361486); *J. Biol. Chem.* 276 (29):27371-27375 (2001); documento WO2004/045553 (Reivindicación 14); documento WO2002/92836 (Reivindicación 6; Fig. 12); documento WO2002/83866 (Reivindicación 15; pág. 116-121); documento US2003/124140 (Ejemplo 16); Referencias cruzadas: GI: 34501467; AAK74120.3; AF361486_1.

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de los megacariocitos, mesotelina, n.º de acceso del Genbank NM_005823) Yamaguchi, N., *et al Biol. Chem.* 269 (2), 805-808 (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96 (20):11531-11536 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93 (1):136-140 (1996), *J. Biol. Chem.* 270 (37):21984-21990 (1995); documento WO2003/101283 (Reivindicación 14); documento WO2002/102235 (Reivindicación

- 13; pág. 287-288); documento WO2002/101075 (Reivindicación 4; pág. 308-309); documento WO2002/71928 (pág. 320-321); documento WO94/10312 (pág. 52-57); Referencias cruzadas: MIM:601051; NP_005814.2; NM_005823_1.
- 5 (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTI1b, SLC34A2, familia 34 de vehículos de solutos (fosfato de sodio), miembro 2, transportador de fosfato dependiente del sodio de tipo II 3b, n.º de acceso del Genbank NM_006424) *J. Biol. Chem.* 277 (22):19665-19672 (2002), *Genomics* 62 (2):281-284 (1999), Feild, J. A., *et al* (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578-582; documento WO2004/022778 (Reivindicación 2); EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; pág. 326); EP0875569 (Reivindicación 1; pág. 17-19); documento WO2001/57188 (Reivindicación 20; pág. 329); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento
- 10 WO2001/75177 (Reivindicación 24; pág. 139-140); Referencias cruzadas: MIM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1.
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de tromboespondina (de tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, n.º de acceso del Genbank AB040878); Nagase T., *et al* (2000) *DNA Res.* 7 (2):143-150); documento WO2004/000997 (Reivindicación 1); documento WO2003/003984 (Reivindicación 1); documento WO2002/06339 (Reivindicación 1; pág. 50); documento WO2001/88133 (Reivindicación 1; pág. 41-43, 48-58); documento WO2003/054152 (Reivindicación 20); documento WO2003/101400 (Reivindicación 11); Acceso: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC: 10737.
- 15 (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008016Rik, ADNc de RIKEN 2700050C12, gen del ADNc de RIKEN 2700050C12, n.º de acceso del Genbank AY358628); Ross *et al* (2002) *Cancer Res.* 62:2546-2553; documento US2003/129192 (Reivindicación 2); documento US2004/044180 (Reivindicación 12); documento US2004/044179 (Reivindicación 11); documento US2003/096961 (Reivindicación 11); documento US2003/232056 (Ejemplo 5); documento WO2003/105758 (Reivindicación 12); documento US2003/206918 (Ejemplo 5); EP1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003/025148 (Reivindicación 20); Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628_1.
- 20 (9) ETBR (receptor de endotelina de tipo B, n.º de acceso del Genbank AY275463); Nakamuta M., *et al* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., *et al* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991; Arai H., *et al* *Jpn. Circ. J.* 56, 1303-1307, 1992; Arai H., *et al* *J. Biol. Chem.* 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., *et al* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N. A., *et al* *J. Biol. Chem.* 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., *et al* *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., *et al* *Gene* 228, 43-49, 1999; Strausberg R. L., *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., *et al* *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., *et al* *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997; Verheij J. B., *et al* *Am. J. Med. Genet.* 108, 223-225, 2002; Hofstra R. M. W., *et al* *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997; Puffenberger E. G., *et al* *Cell* 79, 1257-1266, 1994; Attie T., *et al*, *Hum. Mol. Genet.* 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., *et al* *Hum. Mol. Genet.* 5:351-354, 1996; Amiel J., *et al* *Hum. Mol. Genet.* 5, 355-357, 1996; Hofstra R. M. W., *et al* *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996; Svensson P. J., *et al* *Hum. Genet.* 103, 145-148, 1998; Fuchs S., *et al* *Mol. Med.* 7, 115-124, 2001; Pingault V., *et al* (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206; documento WO2004/045516 (Reivindicación 1); documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento
- 25 WO2004/040000 (Reivindicación 151); documento WO2003/087768 (Reivindicación 1); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/61087 (Fig. 1); documento WO2003/016494 (Fig. 6); documento WO2003/025138 (Reivindicación 12; pág. 144); documento WO2001/98351 (Reivindicación 1; pág. 124-125); EP0522868 (Reivindicación 8; Fig. 2); documento WO2001/77172 (Reivindicación 1; pág. 297-299); documento US2003/109676; documento US6518404 (Fig. 3); documento US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); documento WO2004/001004.
- 30 (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, n.º de acceso del Genbank NM_017763); documento WO2003/104275 (Reivindicación 1); documento WO2004/046342 (Ejemplo 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2003/083074 (Reivindicación 14; pág. 61); documento WO2003/018621 (Reivindicación 1); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig. 93); documento WO2001/66689 (Ejemplo 6); Referencias cruzadas: LocusID:54894; NP_060233.2; M_017763_1.
- 35 (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno prostático epitelial de transmembrana de seis hélices 2, proteína prostática de transmembrana de seis hélices, n.º de acceso del Genbank AF455138); *Lab. Invest.* 82 (11):1573-1582 (2002); documento WO2003/087306; documento US2003/064397 (Reivindicación 1; Fig. 1); documento WO2002/72596 (Reivindicación 13; pág. 54-55); documento WO2001/72962 (Reivindicación 1; Fig. 4B); documento WO2003/104270 (Reivindicación 11); documento WO2003/104270 (Reivindicación 16); documento US2004/005598 (Reivindicación 22); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/060612 (Reivindicación 12; Fig. 10); documento WO2002/26822 (Reivindicación 23; Fig. 2); documento
- 40 WO2002/16429 (Reivindicación 12; Fig. 10); Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138_1.
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, posible canal catiónico de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, n.º de acceso del Genbank NM_017636); Xu, X. Z., *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98 (19):10692-10697 (2001), *Cell* 109 (3):397-407 (2002), *J. Biol. Chem.* 278 (33):30813-30820 (2003); documento US2003/143557 (Reivindicación 4); documento WO2000/40614 (Reivindicación 14; pág. 100-103); documento
- 45 WO2002/10382 (Reivindicación 1; Fig. 9A); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2002/30268 (Reivindicación 27; pág. 391); documento US2003/219806 (Reivindicación 4); documento
- 50 WO2001/62794 (Reivindicación 14; Fig. 1A-D); Referencias cruzadas: MIM:606936; NP_060106.2; NM_017636_1.
- 55
- 60
- 65

- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, n.º de acceso del Genbank NP_003203 o NM_003212); Ciccociola, A., *et al EMBO J.* 8 (7):1987-1991 (1989), *Am. J. Hum. Genet.* 49 (3):555-565 (1991)); documento US2003/224411 (Reivindicación 1); documento WO2003/083041 (Ejemplo 1); documento WO2003/034984 (Reivindicación 12); documento WO2002/88170 (Reivindicación 2; pág. 52-53); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig. 58); documento WO2002/16413 (Reivindicación 1; pág. 94-95, 105); documento WO2002/22808 (Reivindicación 2; Fig. 1); documento US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); documento US5792616 (Fig. 2); Referencias cruzadas: MIM:187395; NP_003203.1; NM_003212_1.
- (14) CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 n.º de acceso del Genbank M26004); Fujisaku *et al* (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J. J., *et al J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., *et al Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J. J., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S. K., *et al* (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320; documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento US2004/005538 (Ejemplo 1); documento WO2003/062401 (Reivindicación 9); documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento WO91/02536 (Fig. 9.1-9.9); documento WO2004/020595 (Reivindicación 1); Acceso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.
- (15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (inmunoglobulina asociada beta), B29, n.º de acceso del Genbank NM_000626 o 11038674); *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (2003) 100 (7):4126-4131, *Blood* (2002) 100 (9):3068-3076, Muller *et al* (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6):1621-1625; documento WO2004/016225 (Reivindicación 2, Fig. 140); documento WO2003/087768, documento US2004/101874 (Reivindicación 1, pág. 102); documento WO2003/062401 (reivindicación 9); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento US2002/150573 (reivindicación 5, pág. 15); documento US5644033; documento WO2003/048202 (reivindicación 1, pág. 306 y 309); documento WO 99/58658, documento US6534482 (reivindicación 13, Fig. 17A/B); documento WO2000/55351 (reivindicación 11, pág. 1145-1146); Referencias cruzadas: MIM:147245; NP_000617.1; NM_000626_1.
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína ancla de fosfatasa que contiene el dominio SH2 1a), SPAP1B, SPAP1C, n.º de acceso del Genbank NM_030764, AY358130); *Genome Res.* 13 (10):2265-2270 (2003), *Immunogenetics* 54 (2):87-95 (2002), *Blood* 99 (8):2662-2669 (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M. J., *et al* (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (3):768-775; documento WO2004/016225 (Reivindicación 2); documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (Reivindicación 5; Fig. 18D-1-18D-2); documento WO2003/097803 (Reivindicación 12); documento WO2003/089624 (Reivindicación 25); Referencias cruzadas: MIM:606509; NP_110391.2; NM_030764_1.
- (17) HER2 (ErbB2, n.º de acceso del Genbank M11730); Coussens L., *et al Science* (1985) 230(4730):1132-1139; Yamamoto T., *et al Nature* 319, 230-234, 1986; Semba K., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J. M., *et al J. Cell Biol.* 165, 869-880, 2004; Kuhns J. J., *et al J. Biol. Chem.* 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., *et al Nature* 421, 756-760, 2003; Ehsani A., *et al* (1993) *Genomics* 15, 426-429; documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/027049 (Fig. 1); documento WO2004/009622; documento WO2003/081210; documento WO2003/089904 (Reivindicación 9); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento US2003/118592; documento WO2003/008537 (Reivindicación 1); documento WO2003/055439 (Reivindicación 29; Fig. 1A-B); documento WO2003/025228 (Reivindicación 37; Fig. 5C); documento WO2002/22636 (Ejemplo 13; pág. 95-107); documento WO2002/12341 (Reivindicación 68; Fig. 7); documento WO2002/13847 (pág. 71-74); documento WO2002/14503 (pág. 114-117); documento WO2001/53463 (Reivindicación 2; pág. 41-46); documento WO2001/41787 (pág. 15); documento WO2000/44899 (Reivindicación 52; Fig. 7); documento WO2000/20579 (Reivindicación 3; Fig. 2); documento US5869445 (Reivindicación 3; Col 31-38); documento WO9630514 (Reivindicación 2; pág. 56-61); documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004/043361 (Reivindicación 7); documento WO2004/022709; documento WO2001/00244 (Ejemplo 3; Fig. 4); Acceso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.
- (18) NCA (CEACAM6, n.º de acceso del Genbank M18728); Barnett T., *et al Genomics* 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., *et al Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 89-96, 1988; Strausberg R. L., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99:16899-16903, 2002; documento WO2004/063709; EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004/044178 (Ejemplo 4); documento WO2004/031238; documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento WO2002/86443 (Reivindicación 27; pág. 427); documento WO2002/60317 (Reivindicación 2); Acceso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728.
- (19) MDP (DPEP1, n.º de acceso del Genbank BC017023); *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99 (26):16899-16903 (2002); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/64798 (Reivindicación 33; pág. 85-87); JP05003790 (Fig. 6-8); documento WO99/46284 (Fig. 9); Referencias cruzadas: MIM:179780; AAH17023.1; BC017023_1.
- (20) IL20R α (IL20Ra, ZCYTOR7, n.º de acceso del Genbank AF184971); Clark H. F., *et al Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Mungall A. J., *et al Nature* 425, 805-811, 2003; Blumberg H., *et al Cell* 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., *et al J. Immunol.* 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., *et al J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., *et al* (2003) *Biochemistry* 42:12617-12624; Sheikh F., *et al* (2004) *J. Immunol.* 172, 2006-2010; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004/005320 (Ejemplo 5); documento WO2003/029262 (pág. 74-75); documento WO2003/002717 (Reivindicación 2; pág. 63); documento WO2002/22153 (pág. 45-47); documento US2002/042366 (pág. 20-21); documento WO2001/46261 (pág. 57-59); documento WO2001/46232 (pág. 63-65); documento WO98/37193 (Reivindicación 1; pág. 55-59); Acceso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

- (21) Brevican (BCAN, BEHAB, n.º de acceso del Genbank AF229053); Gary S. C., *et al Gene* 256, 139-147, 2000; Clark H. F., *et al Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R. L., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99, 16899-16903, 2002; documento US2003/186372 (Reivindicación 11); documento US2003/186373 (Reivindicación 11); documento US2003/119131 (Reivindicación 1; Fig. 52); documento US2003/119122 (Reivindicación 1; Fig. 52); documento US2003/119126 (Reivindicación 1); documento US2003/119121 (Reivindicación 1; Fig. 52); documento US2003/119129 (Reivindicación 1); documento US2003/119130 (Reivindicación 1); documento US2003/119128 (Reivindicación 1; Fig. 52); documento US2003/119125 (Reivindicación 1); (Reivindicación 1); documento WO2002/02634 (Reivindicación 1).
- (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, n.º de acceso del Genbank NM_004442); Chan, J. y Watt, V. M., *Oncogene* 6 (6), 1057-1061 (1991) *Oncogene* 10 (5):897-905 (1995), *Annu. Rev. Neurosci.* 21:309-345 (1998), *Int. Rev. Cytol.* 196:177-244 (2000); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200053216 (Reivindicación 1; pág. 41); documento WO2004065576 (Reivindicación 1); documento WO2004020583 (Reivindicación 9); documento WO2003004529 (pág. 128-132); documento WO200053216 (Reivindicación 1; pág. 42); Referencias cruzadas: MIM:600997; NP_004433.2; NM_004442_1.
- (23) ASLG659 (B7h, n.º de acceso del Genbank AX092328); documento US2004/0101899 (Reivindicación 2); documento WO2003104399 (Reivindicación 11); documento WO2004000221 (Fig. 3); documento US2003/165504 (Reivindicación 1); documento US2003/124140 (Ejemplo 2); documento US2003/065143 (Fig. 60); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; pág. 299); documento US2003/091580 (Ejemplo 2); documento WO2002/10187 (Reivindicación 6; Fig. 10); documento WO2001/94641 (Reivindicación 12; Fig. 7b); documento WO2002/02624 (Reivindicación 13; Fig. 1A-1B); documento US2002/034749 (Reivindicación 54; pág. 45-46); documento WO2002/06317 (Ejemplo 2; pág. 320-321, Reivindicación 34; pág. 321-322); documento WO2002/71928 (pág. 468-469); documento WO2002/02587 (Ejemplo 1; Fig. 1); documento WO2001/40269 (Ejemplo 3; pág. 190-192); documento WO2000/36107 (Ejemplo 2; pág. 205-207); documento WO2004/053079 (Reivindicación 12); documento WO2003/004989 (Reivindicación 1); documento WO2002/71928 (pág. 233-234, 452-453); documento WO 01/16318.
- (24) PSCA (Precursor del antígeno prostático de células madre, n.º de acceso del Genbank AJ297436); Reiter R. E., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., *et al Oncogene* 19, 1288-1296, 2000; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) 275(3):783-788; documento WO2004/022709; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004/018553 (Reivindicación 17); documento WO2003/008537 (Reivindicación 1); documento WO2002/81646 (Reivindicación 1; pág. 164); documento WO2003/003906 (Reivindicación 10; pág. 288); documento WO2001/40309 (Ejemplo 1; Fig. 17); documento US2001/055751 (Ejemplo 1; Fig. 1b); documento WO2000/32752 (Reivindicación 18; Fig. 1); documento WO98/51805 (Reivindicación 17; pág. 97); documento WO98/51824 (Reivindicación 10; pág. 94); documento WO98/40403 (Reivindicación 2; Fig. 1B); Acceso: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.
- (25) GEDA (n.º de acceso del Genbank AY260763); proteína de tipo pareja de fusión de HMGIC de lipoma AAP14954/pid=AAP14954.1 - *Homo sapiens* (humana); documento WO2003/054152 (Reivindicación 20); documento WO2003/000842 (Reivindicación 1); documento WO2003/023013 (Ejemplo 3, Reivindicación 20); documento US2003/194704 (Reivindicación 45); Referencias cruzadas: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763_1.
- (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor 3 de BLYS, BR3, n.º de acceso del Genbank AF116456); receptor de BAFF/pid=NP_443177.1 - *Homo sapiens*: Thompson, J. S., *et al Science* 293 (5537), 2108-2111 (2001); documento WO2004/058309; documento WO2004/011611; documento WO2003/045422 (Ejemplo; pág. 32-33); documento WO2003/014294 (Reivindicación 35; Fig. 6B); documento WO2003/035846 (Reivindicación 70; pág. 615-616); documento WO2002/94852 (Col 136-137); documento WO2002/38766 (Reivindicación 3; pág. 133); documento WO2002/24909 (Ejemplo 3; Fig. 3); Referencias cruzadas: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600.
- (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, n.º de acceso del Genbank AK026467); Wilson *et al* (1991) *J. Exp. Med.* 173:137-146; documento WO2003/072036 (Reivindicación 1; Fig. 1); Referencias cruzadas: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1.
- (28) CD79a (CD79A, CD79 α , inmunoglobulina asociada alfa, una proteína específica de los linfocitos B que interacciona de manera covalente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de IgM, transduce una señal que participa en la diferenciación de los linfocitos B), pl: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] *Gene Chromosome*: 19q13.2, n.º de acceso del Genbank NP_001774.10); documento WO2003/088808, documento US2003/0228319; documento WO2003/062401 (reivindicación 9); documento US2002/150573 (reivindicación 4, pág. 13-14); documento WO99/58658 (reivindicación 13, Fig. 16); documento WO92/07574 (Fig. 1); documento US5644033; Ha *et al* (1992) *J. Immunol.* 148(5): 1526-1531; Müller *et al* (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:1621-1625; Hashimoto *et al* (1994) *Immunogenetics* 40(4):287-295; Preud'homme *et al* (1992) *Clin. Exp. Immunol.* 90(1):141-146; Yu *et al* (1992) *J. Immunol.* 148(2) 633-637; Sakaguchi *et al* (1988) *EMBO J.* 7(11):3457-3464.
- (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, receptor acoplado a la proteína G que es activado por la quimiocina CXCL13, funciona en la migración de los linfocitos y la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y, quizás, en el desarrollo del SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pl: 8.54 PM: 41.959 TM: 7 [P] *Gene Chromosome*: 11q23.3, n.º de acceso del Genbank NP_001707.1); documento WO2004/040000; documento WO2004/015426; documento US2003/105292 (Ejemplo 2); documento US6555339 (Ejemplo 2); documento WO2002/61087 (Fig. 1); documento WO2001/57188 (Reivindicación 20, pág. 269); documento WO2001/72830 (pág. 12-13); documento WO2000/22129 (Ejemplo 1, pág. 152-153, Ejemplo 2, pág.

254-256); documento WO99/28468 (reivindicación 1, pág. 38); documento US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); documento WO94/28931 (pág. 56-58); documento WO92/17497 (reivindicación 7, Fig. 5); Dobner *et al* (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2795-2799; Barella *et al* (1995) *Biochem. J.* 309:773-779.

(30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula del MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a los péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+); 273 aa, pl: 6.56, PM: 30820.TM: 1 [P] *Gene Chromosome*: 6p21.3, n.º de acceso del Genbank NP_002111.1); Tonnellet *et al* (1985) *EMBO J.* 4(11):2839-2847; Jonsson *et al* (1989) *Immunogenetics* 29(6):411-413; Beck *et al* (1992) *J. Mol. Biol.* 228:433-441; Strausberg *et al* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 99:16899-16903; Servenius *et al* (1987) *J. Biol. Chem.* 262:8759-8766; Beck *et al* (1996) *J. Mol. Biol.* 255:1-13; Naruse *et al* (2002) *Tissue Antigens* 59:512-519; documento WO99/58658 (reivindicación 13, Fig. 15); documento US6153408 (Col 35-38); documento US5976551 (col 168-170); documento US6011146 (col 145-146); Kasahara *et al* (1989) *Immunogenetics* 30(1):66-68; Larhammar *et al* (1985) *J. Biol. Chem.* 260(26):14111-14119.

(31) P2X5 (canal iónico 5 abierto por el ligando P2X del receptor purinérgico, un canal iónico abierto por ATP extracelular, puede participar en la transmisión sináptica y la neurogénesis, su deficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad detrusora idiopática); 422 aa, pl: 7.63, PM: 47206 TM: 1 [P] *Gene Chromosome*: 17p13.3, n.º de acceso del Genbank NP_002552.2); Le *et al* (1997) *FEBS Lett.* 418(1-2):195-199; documento WO2004/047749; documento WO2003/072035 (reivindicación 10); Touchman *et al* (2000) *Genome Res.* 10:165-173; documento WO2002/22660 (reivindicación 20); documento WO2003/093444 (reivindicación 1); documento WO2003/087768 (reivindicación 1); documento WO2003/029277 (pág. 82).

(32) CD72 (antígeno de la diferenciación de linfocitos B CD72, Lyb-2); 359 aa, pl: 8.66, PM: 40225, TM: 1 [P] *Gene Chromosome*: 9p13.3, n.º de acceso del Genbank NP_001773.1); documento WO2004042346 (reivindicación 65); documento WO2003/026493 (pág. 51-52, 57-58); documento WO2000/75655 (pág. 105-106); Von Hoegen *et al* (1990) *J. Immunol.* 144(12):4870-4877; Strausberg *et al* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 99:16899-16903.

(33) LY64 (Antígeno linfocítico 64 (RP105), proteína de la membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación y la apoptosis de los linfocitos B, la pérdida de función está asociada con el aumento de la actividad patológica en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pl: 6.20, PM: 74147 TM: 1 [P] *Gene Chromosome*: 5q12, n.º de acceso del Genbank NP_005573.1); documento US2002/193567; documento WO97/07198 (reivindicación 11, pág. 39-42); Miura *et al* (1996) *Genomics* 38(3):299-304; Miura *et al* (1998) *Blood* 92:2815-2822; documento WO2003/083047; documento WO97/44452 (reivindicación 8, pág. 57-61); documento WO2000/12130 (pág. 24-26).

(34) FcRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de las inmunoglobulinas que contiene dominios ITAM y de tipo Ig de tipo C2, pueden tener un papel en la diferenciación de los linfocitos B); 429 aa, pl: 5.28, PM: 46925 TM: 1 [P] *Gene Chromosome*: 1q21-1q22, n.º de acceso del Genbank NP_443170.1); documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (reivindicación 6, Fig. 18E-1-18E-2); Davis *et al* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 98(17):9772-9777; documento WO2003/089624 (reivindicación 8); documento EP1347046 (reivindicación 1); documento WO2003/089624 (reivindicación 7).

(35) IRTA2 (FcRH5, 2 asociada a la translocación del receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas, un inmunorreceptor putativo con posibles papeles en el desarrollo y la linfomagénesis de los linfocitos B, la desregulación del gen por translocación tiene lugar en algunas neoplasias malignas de linfocitos B); 977 aa, pl: 6.88, PM: 106468, TM: 1 [P] *Gene Chromosome*: 1q21, n.º de acceso del Genbank, ser humano: AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; ratón: AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1; documento WO2003/024392 (reivindicación 2, Fig. 97); Nakayama *et al* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1):124-127; documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (reivindicación 3, Fig. 18B-1-18B-2).

(36) TENB2 (TMEFF2, tomoregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano de la transmembrana putativa, relacionado con la familia de EGF/heredulina de factores de crecimiento y follistatina); 374 aa, acceso del NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; n.º de acceso del Genbank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; documento WO2004/074320; documento JP2004113151; documento WO2003/042661; documento WO2003/009814; documento EP1295944 (pág. 69-70); documento WO2002/30268 (pág. 329); documento WO2001/90304; documento US2004/249130; documento US2004/022727; documento WO2004/063355; documento US2004/197325; documento US2003/232350; documento US2004/005563; documento US2003/124579; Horie *et al* (2000) *Genomics* 67:146-152; Uchida *et al* (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:593-602; Liang *et al* (2000) *Cancer Res.* 60:4907-12; Glynn-Jones *et al* (2001) *Int J Cancer.* 15 de octubre; 94(2):178-84.

Métodos y composiciones recombinantes

Se pueden producir anticuerpos usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en el documento US 4816567. En una realización, se proporciona el ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprenda la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprenda la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una

secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo; o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una realización, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula linfocítica (por ejemplo, Y0, NS0, célula Sp20). En una realización, se proporciona un método de fabricación de un anticuerpo, en la que el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, extraer el anticuerpo de la célula hospedadora (o medio de cultivo de la célula hospedadora).

Para la producción recombinante de un anticuerpo, ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para su posterior clonación y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico se puede aislar fácilmente y secuenciar usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifiquen las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifiquen el anticuerpo incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glicosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, el documento US 5648237; el documento US 5789199; el documento US 5840523; Charlton, "Methods in Molecular Biology", vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, (2003), pág. 245-254, que describen la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o las levaduras son hospedadores adecuados de clonación o expresión para los vectores que codifican anticuerpos, incluyendo las cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glicosilación se han "humanizado", dando lugar a la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o plenamente humano (Gerngross, (2004) *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414; Li *et al.* (2006) *Nat. Biotech.* 24: 210-215).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se puede usar en combinación con células de insectos, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales también se pueden utilizar como hospedadores (documento US 5959177, documento US 6040498, documento US 6420548, documento US 7125978, documento US 6417429, que describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados también se pueden usar como hospedadores. Pueden ser útiles, por ejemplo, las líneas celulares de mamíferos que se han adaptado para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.* (1977, *J. Gen. Virol.* 36:59); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 según lo descrito, por ejemplo, en Mather, (1980) *Biol. Reprod.* 23: 243-251); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); las células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa); células de riñón canino (MDCK; células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.* (1982) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub *et al.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:4216); y líneas de células de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, "Methods in Molecular Biology", Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pág. 255-268 (2003).

Ensayos

Los anticuerpos se pueden identificar, rastrear en busca de o caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica. Un anticuerpo usado en los métodos de la invención se puede ensayar para determinar su actividad de unión al antígeno, por ejemplo, mediante métodos conocidos tales como ELISA, transferencia Western, etc. Se pueden usar ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compita con otro anticuerpo conocido por la unión al antígeno. En algunos ensayos, un anticuerpo competitivo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que es unido por el anticuerpo conocido. En Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ), se proporcionan métodos ilustrativos detallados para la cartografía de un epítipo al que se une un

anticuerpo.

En un ensayo de competición ilustrativo, se incuba el antígeno inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno (por ejemplo, HER2 o CD20) y un segundo anticuerpo no marcado que se ensaya para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba el antígeno inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo sin marcar. Después de la incubación en condiciones que permitan la unión del primer anticuerpo con un antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de ensayo con respecto a la muestra de control, eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Se pueden usar ensayos para la identificación de anticuerpos de los mismos que tengan actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la inhibición tumoral.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de los métodos de la invención son útiles para detectar la presencia de un antígeno en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. La muestra biológica comprende plasma, suero, células o tejido. Un método descrito en el presente documento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo al antígeno, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el antígeno. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En el método descrito en el presente documento, se usa un anticuerpo para seleccionar los sujetos aptos para el tratamiento con un anticuerpo, por ejemplo, donde la proteína antigénica expresada es un biomarcador para la selección de los pacientes. Los trastornos ilustrativos que se pueden diagnosticar usando un anticuerpo de los métodos de la invención incluyen cáncer y trastornos inmunes.

En ciertas realizaciones de los métodos de la invención, se utilizan anticuerpos conjugados. En el presente documento, se describen anticuerpos conjugados con marcadores, donde los marcadores incluyen marcadores y restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, densos en electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ilustrativos incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (documento US 4737456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

Los restos de fármacos que efectúan la destrucción de las células pueden unirse covalentemente a los anticuerpos a través de una unidad de enlazador para formar conjugados de anticuerpo-fármaco para los efectos terapéuticos de destrucción de células específicas. Una realización ilustrativa de un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) comprende un anticuerpo (Ab) que se dirige a una célula tumoral, y un resto farmacológico citotóxico o citostático (D), y un resto enlazador (L) que une el Ab a D. El anticuerpo es unido a través de uno o más restos de aminoácidos, tales como lisina y cisteína, por el resto enlazador (L) a D; la composición que tiene la Fórmula I:



donde p es 1 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. El número de restos de fármaco que se pueden conjugar a través de un resto enlazador reactivo a una molécula de anticuerpo puede estar limitado por el número de restos de cisteína libres que son introducidos por los métodos descritos en el presente documento.

El resto farmacológico (D) de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) incluye cualquier compuesto, resto o grupo que tenga un efecto citotóxico o citostático. Los restos de fármaco pueden conferir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen, pero sin limitación, la unión a tubulina, la unión o la intercalación de ADN y la inhibición de la ARN polimerasa, la síntesis de proteínas y la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas de gran tamaño. Los restos de fármaco ilustrativos incluyen, pero sin limitación, un maitansinoide, dolastatina, auristatina, caliqueamicina, pirrolobenzodiazepina (PBD), PNU-159682, antraciclina, duocarmicina, alcaloides de la vinca, taxano, tricoteceno, CC1065, duocarmicina, camptotecina, elinafida y estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados de los mismos, y que incluyen los derivados de estos fármacos que tienen actividad citotóxica.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) son agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos diseñados para reducir las toxicidades inespecíficas y aumentar la eficacia con respecto a la quimioterapia contra el cáncer de moléculas pequeñas y anticuerpos convencional. Emplean la potente capacidad de dirección de anticuerpos monoclonales para administrar específicamente agentes terapéuticos de molécula pequeñas conjugada, altamente potentes, a una célula cancerosa. Para evaluar propiedades tales como la farmacocinética y la toxicidad de estos conjugados de anticuerpo-fármaco, es útil poder caracterizarlos y cuantificarlos en plasma, orina y otras muestras biológicas. Se han desvelado métodos de detección y rastreo de los conjugados de anticuerpo-fármaco mediante la captura a través de membrana de inmunofinidad (IAM) y espectrometría de masas (documento US 2005/0232929), incluyendo los métodos de captura de afinidad basados en perlas (documento US 2009/0286258).

MÉTODOS DE MEDICIÓN DE ANTICUERPOS HUMANOS Y HUMANIZADOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Un aspecto de la invención es un método basado en LC-MS/MS genérico reproducible, eficaz y económico para la cuantificación de diversos agentes terapéuticos de anticuerpos monoclonales humanos y humanizados (mAb) con una estructura de armazón de anticuerpos común en muestras de plasma y de tejido de mono cynomolgus y de rata, y potencialmente otras especies no humanas, de estudios preclínicos. La digestión de anticuerpos da péptidos que son únicos para los anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados administrados, y que no se encuentran en las proteínas de mono y rata endógenas.

La Figura 9 muestra el método de LC-MS/MS genérico para cuantificar un anticuerpo terapéutico en plasma/suero de animal usando uno o más péptidos de cambio de marco (FSP).

Los métodos de la invención incluyen una metodología genérica de cuantificación de anticuerpos humanos o humanizados que comprende las etapas de:

- (a) tratar una muestra biológica con una enzima digestiva para formar una muestra de anticuerpo digerida, en la que la muestra de suero o plasma es de un animal que ha sido tratado con un anticuerpo humano o humanizado; y
- (b) analizar la muestra de anticuerpo digerida mediante espectrometría de masas para detectar y medir la concentración de uno o más péptidos humanos, en la que los péptidos humanos comprenden una o más secuencias seleccionadas de SEQ ID NOS. 1-8;

en la que la enzima digestiva es tripsina. Otras proteasas alternativas pueden generar péptidos adicionales además de los que tienen SEQ ID NOS. 1-8. Otras enzimas específicas descritas en el presente documento incluyen la endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, estafilococo aureus V8 y endoproteinasa GluC. También se describen las proteasas inespecíficas tales como la papaína. Los péptidos generados para la cuantificación pueden tener diferentes secuencias que con la tripsina, pero el concepto de uso de un péptido genérico presente en seres humanos y no presente en anticuerpos de animal es el mismo.

En otra realización, el método comprende además poner en contacto la muestra de anticuerpo digerida con un medio de captura por afinidad o limpieza de la muestra por extracción en fase sólida (SPE), y eluir una muestra de anticuerpo digerida enriquecida.

En otra realización, el método incluye la captura de afinidad del anticuerpo que comprende uno o más péptidos humanos que tienen secuencias seleccionadas de SEQ ID NOS. 1-8, seguida de la digestión. El método de captura por afinidad se puede realizar mediante Proteína A o G.

En los métodos de la invención, la muestra biológica es suero, plasma, tejido o células derivadas de un mamífero no humano.

En una demostración ilustrativa del método, el anticuerpo es trastuzumab anti-HER2 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc.). Otros anticuerpos se sometieron a los métodos de la invención. Los anticuerpos que se han digerido con tripsina en plasma no clínico y analizado incluyen anti-MUC16, anti-MSLN (mesotelina), anti-Steap1, anti-CD20 (2H7 y rituximab), anti-HER3 (2C4, pertuzumab), anti-NRP1, anti-PDL1, anti-LRP6, anti-B7-H4, anti-GFRA1 7C9, anti-NRG1 y anti-LY6E.

En otra realización, la muestra de anticuerpo se analizó con una captura por afinidad de inmunoprecipitación (IP) mediante proteína A/G soportada en perlas.

PÉPTIDOS DE CAMBIO DE MARCO

Las regiones marco de los anticuerpos humanos se conservan en gran medida. La Figura 1 muestra la secuencia de alineación de secuencias de aminoácidos de cadena pesada de un anticuerpo 2H7 humano ocrelizumab (SEQ ID NO: 11) y cinco anticuerpos anti-CD20 de mono cynomolgus: CynoHC 1a D3 1 (SEQ ID NO: 12), CynoHC 1b E5 1 (SEQ ID NO: 13), Cyno HC 2a (SEQ ID NO: 14), CynoHC 2b E6 1 (SEQ ID NO: 15), CynoHC 3 (SEQ ID NO: 16). Se identifican péptidos de cambio de marco (FSP 1-8) que son únicos para Mab 2H7 humano (hu 2H7) y que no están

5 presentes en la cadena pesada de IgG de mono cynomolgus, portando cada uno al menos una diferencia de aminoácido en las secuencias. Basándose en la información de la secuencia disponible, los péptidos de cambio de marco (FSP 1-8) son solo únicos para el anticuerpo humano y no para las variantes de IgG de cynomolgus. Los péptidos de cambio de marco (FSP 1-8) de la Tabla 2 también están presentes en la IgG1 endógena y, en algunos casos, en IgG2, IgG3 e IgG4. Estos péptidos también son comunes entre otros anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados e IgG humanas.

Tabla 2. Péptidos de cambio de marco de cadena pesada (FSP 1-8) de mAb Hu

FSP	Secuencia	PM	SEQ ID NO:
FSP1	GPSVFPLAPSSK	1185,6	1
FSP2	STSGGTAALGCLVK	1263,6	2
FSP3	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	2081,01	3
FSP4	FNWYVDGVEVHNAK	1676,8	4
FSP5	VVSVLTVLHQDWLNGK	1807,0	5
FSP6	ALPAPIEK	837,5	6
FSP7	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	2543,1	7
FSP8	TPPPVLDSDGSFFLYSK	1872,9	8
8 péptidos de cambio de marco (FSP) con restos únicos (en negrita) para la IgG humana			

10 Se usó Trastuzumab (HERCEPTIN[®], Genentech) como patrón de referencia modelo y se añadió en plasma de mono cynomolgus y de rata, seguido de la digestión plasma entero directa con o sin preconcentración de SPE o inmunoprecipitación por perlas magnéticas con proteína A/G y una posterior digestión sobre las perlas antes del análisis de LC-MS/MS. Se estableció un intervalo de calibración de trabajo en 1-1.000 µg/ml en ambas matrices de plasma. También se ensayó la especificidad y se confirmó tanto con control negativo de plasma en blanco como con muestras de plasma con adición.

15 Trastuzumab (HERCEPTIN[®], huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Genentech) es una versión de anticuerpo monoclonal, IgG1 kappa, humanizado derivado de ADN recombinante, del anticuerpo HER2 murino que se une selectivamente con alta afinidad en un ensayo basado en células (Kd = 5 nM) al dominio extracelular de la proteína receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, HER2 (ErbB2) (documento US 5821337, documento US 6054297, documento US 6407213, documento US 6639055; Coussens L., *et al* (1985) *Science* 230:1132-9; Slamon D. J., *et al* (1989) *Science* 244:707-12). Trastuzumab contiene regiones marco humanas con las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo murino (4D5) que se une a HER2. Trastuzumab se une al antígeno HER2 e inhibe así el crecimiento de células cancerosas. Trastuzumab ha demostrado, tanto en ensayos *in vitro* como en animales, inhibir la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan HER2 (Hudziak R. M., *et al* (1989) *Mol Cell Biol* 9:1165-72; Lewis G. D., *et al* (1993) *Cancer Immunol Immunother*; 37:255-63; Baselga J., *et al* (1998) *Cancer Res.* 58:2825-2831). Trastuzumab es un mediador de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, ADCC (Hotaling T. E., *et al* (1996) [sumario]. *Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res*; 37:471; Pegram M. D., *et al* (1997) [sumario]. *Proc Am Assoc Cancer Res*; 38:602; Sliwkowski *et al* (1999) *Seminars in Oncology* 26(4), Supl 12:60-70; Yarden Y. y Sliwkowski, M. (2001) "Nature Reviews: Molecular Cell Biology", Macmillan Magazines, Ltd., Vol. 2:127-137). HERCEPTIN[®] se aprobó en 1998 para el tratamiento de pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresaban ErbB2 (Baselga *et al*, (1996) *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744).

35 Se pueden usar análogos marcados por isótopos estables (SIL) de FSP1-8 (SEQ ID NOS: 1-8) como patrones internos *in situ* (añadidos). Los marcadores de isótopos estables típicos incluyen ¹³C, ¹⁵N y ²H. Los patrones internos se pueden incorporar a uno o más restos de aminoácidos de la secuencia peptídica. Los patrones internos se pueden introducir en la muestra antes o después de la digestión, y funcionan para compensar las variaciones que se producen durante el análisis de LC-MS/MS (por ejemplo, cambios en el rendimiento del automuestreador, la separación por LC y las respuestas de la MS). Por ejemplo, se preparó una versión marcada con isótopo estable de FSP8 donde la lisina entre fenilalanina (F) y tirosina (Y) se marcó con ¹³C y ¹⁵N.

40 Basándose en sus características de MS, se seleccionó empíricamente FSP8 debido a su respuesta de la señal más intensa como el péptido primario para la cuantificación. Además, se controlaron otros tres péptidos, FSP4, FSP5 y FSP3, para la confirmación cualitativa. Cada uno de estos cuatro péptidos se pudo usar como sustituto para cuantificar el mAb en matrices biológicas animales. En el ensayo, se usaron sus IS de SIL correspondientes (Tabla 3). FSP6 solo se puede usar en matrices de animales distintos del mono cynomolgus, pues se detectó un fondo de interferencia de coelución en el plasma del mono cynomolgus. Se observó ionización relativamente débil para FSP1, FSP5 y FSP2.

Tabla 3. Patrones internos marcados con isótopos estables correspondientes

Patrón interno	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
FSP8 IS	TTPPVLDSDGSFFL* (¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁) YSK	8
FSP4 IS	FNWYVDGVEV* (¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₁) HNAK	4
FSP5 IS	VVSVLTVLHQDWL* (¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁) NGK	5
FSP3 IS	TPEVTcVVVDVSHEDPEV* (¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₁) K	3
* denota aminoácido que contiene marcaje con isótopos estables c denota resto de cisteína que ha sido alquilado con yodoacetamida.		

ANTICUERPOS HUMANOS Y HUMANIZADOS

- 5 La Figura 2 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 17) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 18) de trastuzumab (Herceptin[®], Genentech Inc.; rhuMABHER2, Anti p185HER2), un anticuerpo monoclonal humanizado derivado recombinante, n.º registro CAS 180288-69-1.
- 10 La Figura 3 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 11) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 19) de ocrelizumab, rhuMAB 2H7, PRO70769, un anticuerpo anti-CD20 humanizado, n.º registro CAS 637334-45-3.
- 15 La Figura 4 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 20) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 21) de pertuzumab, rhuMAB 2C4, n.º registro CAS 380610-27-5. FSP2, FSP3, FSP8 se identifican subrayándolos en la cadena pesada (SEQ ID NO: 20).
- 20 La Figura 5 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 22) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 23) de anti-PDL1, miembro de la familia CD28/CTLA-4 ampliada de los reguladores de linfocitos T. FSP2, FSP4, FSP8 se identifican subrayándolos en la cadena pesada (SEQ ID NO: 22).
- 25 La Figura 6 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 24) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 25) de anti-neuropilina-1, anti-NRP1, MNRP1685A. FSP2, FSP4, FSP8 se identifican subrayándolos en la cadena pesada (SEQ ID NO: 24). Anti-NRP1 es un anticuerpo monoclonal humano, derivado de fago, recombinante que se dirige específicamente a la neuropilina-1 (NRP1), un receptor multi-dominio conocido por unirse a varios ligandos, incluyendo los miembros de la familia de VEGF. Anti-NRP1 ha demostrado eficacia en combinación con anti-VEGF en modelos de xenoinjerto de ratón y potente farmacocinética no lineal a través de un amplio intervalo de dosis en especies preclínicas. Se está evaluando actualmente en estudios de fase I como agente único y en combinación con bevacizumab con o sin paclitaxel.
- 30 La Figura 7 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 26) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 27) de anti-MUC16, DMUC4064A. FSP2, FSP4, FSP8 se identifican subrayándolos en la cadena pesada (SEQ ID NO: 26).
- 35 La Figura 8 muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 28) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 19) de rituximab, C2B8, MabThera[®], (Rituxan[®], Genentech Inc., Biogen/Idec). FSP2, FSP4, FSP8 se identifican subrayándolos en la cadena pesada (SEQ ID NO: 28). Rituximab (RITUXAN[®], Genentech/Biogen Idec; Mabthera[®], Roche, REDITUX[®], n.º de registro CAS 174722-31-7) es un anticuerpo monoclonal humano/murino quimérico, diseñado por ingeniería genética, dirigido contra el antígeno CD20. Rituximab es el anticuerpo denominado "C2B8" en la documento US 5736137. Rituximab está indicado para el tratamiento de pacientes con NHL de linfocitos B, CD20-positivo, recidivante o refractario, de bajo grado o folicular. Rituximab se une a CD-20 de la superficie celular y provoca el agotamiento de los linfocitos B (Cartron *et al* (2002) *Blood* 99: 754-758; Idusogie *et al* (2000) *J. Immunol.* 164: 4178-4184; Grillo-López A. J., *et al* (1999) *Semin Oncol*; 26:66-73; documento US 5736137). RITUXAN (documento US 5677180, documento US 5736137) es el anticuerpo monoclonal más usado en las neoplasias hematopoyéticas, y está establecido en la práctica clínica generalizada. RITUXAN[®] recibió por primera vez la autorización de la FDA en 1997 para el tratamiento del linfoma de no Hodgkin (NHL) de linfocitos B, CD20-positivo, recidivante o refractario, de bajo grado o folicular. También fue aprobado en la Unión Europea con el nombre comercial MabThera[®] en junio de 1998. En febrero de 2006, RITUXAN también recibió la aprobación de la FDA en combinación con el metotrexato para reducir los signos y los síntomas en pacientes adultos con artritis reumatoide de moderada a gravemente activa que habían tenido una respuesta inadecuada a uno o más tratamientos con antagonistas del TNF. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo rituximab (también designado C2B8) y los métodos ilustrativos para su producción mediante la expresión recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) se desvelan en la patente de EE.UU. n.º 5.736.137.
- 40
- 45
- 50

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La Figura 15 muestra un dibujo de la captura de mAb de plasma/suero de animal sobre perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina unidas a una sonda de captura biotinilada o perlas magnéticas recubiertas con proteína A, G, seguida del aislamiento por separación magnética, digestión del anticuerpo capturado y análisis por LC-MS/MS.

La Figura 16 muestra realizaciones de la perla magnética recubierta con proteína A, G (parte superior) para la captura genérica de anticuerpos y perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina unidas a una sonda de captura biotinilada (parte inferior) para la captura específica de anticuerpos.

El potencial de la inmunoprecipitación para aislar de manera eficaz y reproducible el anticuerpo monoclonal diana (mAb) con proteína A se evaluó en dos formatos: (a) Proteína A acoplada a perlas magnéticas y (b) Proteína A recubierta sobre una placa de microtitulación de 96 pocillos. En un ensayo preliminar, una placa de microtitulación con Proteína A también fue de capacidad limitada en comparación con las perlas magnéticas con Proteína A en la captura de la carga aplicada total de IgG endógenas junto con el Mab diana, en particular, a partir del plasma de mono. Se seleccionó la digestión sobre perlas usando perlas magnéticas con Proteína A para evaluar el aislamiento de plasma de ratas Sprague-Dawley y de mono *Cynomolgus* tratado tanto con litio como con heparina. También se ensayó la digestión del plasma entero seguida de la extracción en fase sólida (SPE), y se encontró menos eficaz en la eliminación de la interferencia de ruido de fondo.

SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se investigaron dos metodologías para evaluar la especificidad de FSP, la sensibilidad de detección y la reproducibilidad: (1) digestión/SPE en plasma entero (extracción en fase sólida), y (2) inmunoprecipitación (IP).

Se evaluaron muestras de plasma de mono (*Cynomolgus*) y de rata ($n = 10$ lotes de cada especie) para determinar la especificidad de lote a lote, los posibles efectos de las interferencias y la reproducibilidad. Junto con un control de plasma en blanco, se enriquecieron las muestras de plasma en blanco, es decir, recibieron la adición de 20 $\mu\text{g/ml}$ de trastuzumab. Se preparó un conjunto de muestras de trastuzumab de calibración que variaron de 1 a 1.000 $\mu\text{g/ml}$ de trastuzumab en matriz de plasma combinado, y se procesaron en paralelo con muestras de plasma de rata y mono individuales.

La Figura 12 muestra una curva de calibración de trastuzumab (usando FSP8 como sustituto) con adiciones de diversas concentraciones de 1 a 1.000 $\mu\text{g/ml}$ en plasma de mono *Cynomolgus* con heparina de litio preparado mediante la metodología de digestión de plasma entero/SPE. Se prepararon patrones internos de péptidos marcados por isótopos estables (IS) en acetonitrilo al 20 % para preparar la solución de patrón interno de trabajo que contenía las concentraciones apropiadas.

La Figura 14 muestra las etapas para la inmunoprecipitación (IP) de anticuerpos monoclonales y la generación de péptidos de cambio de marco (FSP) correspondientes en plasma o suero de animal. Los protocolos se definen en los Ejemplos 1-4.

Se prepararon muestras de animales por inmunoprecipitación (IP) con perlas paramagnéticas recubiertas con Proteína A (Millipore), seguida de la digestión con tripsina. En una placa de microtitulación de fondo cónico de 96 pocillos (VWR Scientific), se dispuso una parte alícuota de 25 μl de plasma o suero diluido [dilución 1:2 v/v con tampón de carga (SN1) de Tween 20/clorhidrato de Trizma (1 M)/cloruro sódico (5 M)/EDTA (0,5 M)/agua/BSA 0,1:5,0:3,0:0,2:91,7:0,1, v/v/v/v/v/p], junto con 125 μl de tampón de carga. Se añadió parte alícuota de 25 μl de perlas magnéticas recubiertas con Proteína A, previamente lavadas y se resuspendidas en tampón de carga, a cada pocillo. A continuación, se incubó la mezcla a temperatura ambiente (TA) durante 120 minutos bajo el mezclado constante para permitir la captura de los mAb. Se desechó el sobrenadante y se lavaron las perlas a fondo en tampón de lavado (SN2) de clorhidrato de Trizma (1 M)/cloruro de sodio (5 M)/EDTA (0,5 M)/agua 5,0:3,0:0,2:91,8, v/v/v/v). El lavado y la separación magnética se realizaron usando un lavador de microplacas (BioTek, VT, EE.UU.) y un imán plano de 96 pocillos (Biotek), respectivamente. El proceso de lavado/separación también se pudo realizar con un procesador de partículas magnéticas KingFisher 96 (Thermo Scientific).

Tras la inmunoprecipitación (IP), se añadió una parte alícuota de 25 μl de solución IS de trabajo a cada pocillo, a excepción de los blancos, a los que se añadieron 25 μl de acetonitrilo al 20 % en su lugar. Se añadieron alícuotas de 75 μl de solución RapiGest (polvo RapiGest/bicarbonato de amonio 50 mM, acetonitrilo 0,05:37,5:10, p/v/v) y 10 μl de DTT 0,1 M. Se cubrió la placa con una lámina de sellado adhesiva (VWR Scientific) y se sacudió suavemente durante aproximadamente 1 minuto, tras lo que se incubó a 60 °C durante 60 minutos. Se añadió un volumen de 25 μl de ácido yodoacético (0,1 M), y la placa se cubrió con una lámina de aluminio y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos protegida de la luz. Se añadió una alícuota de 10 μl de solución de tripsina (0,250 mg/ml) a cada pocillo, y se incubó la placa a 37 °C durante aproximadamente 90 minutos. La digestión se terminó mediante la adición de 15 μl de HCl 2 M a cada pocillo e incubando la placa a 37 °C durante 30 minutos. Las muestras se transfirieron luego mediante Tomtec (CT, EE.UU.) a una placa de filtro HTS Multiscreen

(0,45 µm, Millipore) situada en la parte superior de una placa colectora de fondo cónico de 96 pocillos, y se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 rpm para recoger el filtrado. Se selló la placa colectora, y se inyectó directamente un volumen de 20 µl de filtrado en LC-MS/MS.

5 ELISA y LC-MS/MS

Se compararon el ELISA (Figura 19a) y LC-MS/MS (Figura 19b) en la medición de anticuerpos totales en plasma de rata tras una sola dosis de anticuerpo. La Figura 19a muestra un dibujo del anticuerpo monoclonal (mAb terapéutico) capturado mediante la unión a un dominio extracelular inmovilizado (ECD) o anticuerpo policlonal anti-IgG humana, y detectado con un anticuerpo policlonal anti-IgG humana marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en un ensayo ELISA con la detección de sustrato electroquimioluminiscente, colorimétrico o cromóforo.

Se llevó a cabo la separación cromatográfica líquida bien mediante un sistema LC binario HP Agilent serie 1100 o un sistema LC-10ADvp binario Shimadzu con una columna PA-A C18 BioSuite de fase inversa (2,1 x 50 mm, 3 µm, Waters) manejada a un caudal de 200 µl/min. La columna se mantuvo a 50 °C mediante un calentador de columna (Analytical Sales and Products, NJ, EE.UU.). La fase móvil consistía en A: ácido fórmico al 0,1 % en agua y B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo/metanol (75:25, v/v). Se mantuvo la condición de gradiente en B al 5 % durante 0,4 min, rampa de B al 40 % en 3,4 min, aumento adicional a B al 95 % en 1 min, mantenimiento de B al 95 % durante 0,5 min antes de volver a B al 5 % en 0,1 min. Después se mantuvo al 5 % durante 0,5 min antes de volver a B al 95 % en 0,1 min, y se mantuvo el nivel durante 0,5 min para reducir el potencial de arrastre. Finalmente, se retomó el gradiente de B al 5 % en 0,1 min y se volvió a equilibrar a B al 5 % durante 0,9 min. El tiempo total de procesamiento de la LC fue de 7,5 min. Las muestras se inyectaron usando un automuestreador CTC HTS PAL (LEAP Technologies, Carolina del Norte, EE.UU.) con un bucle de inyección de 20 µl. El lavado 1 del automuestreador fue acetonitrilo/isopropanol/trifluoroetanol/metanol/agua/ácido fórmico (60:15:15:5:5:0,2, en volumen) y el lavado 2 fue agua/acetonitrilo/ácido fórmico (95:5:0,2, en volumen).

Para la cuantificación, se usó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Sciex API 4000® (AB Sciex, CA, EE.UU.) dotado de pulverización de iones turbo. El instrumento de MS se manejó en el modo de iones positivos con la temperatura de fuente fijada en 500 °C y la tensión de pulverización de iones, a 5.000 V. Los parámetros del gas se establecieron con el gas de cortina en 25, el gas nebulizador a 45 y el gas auxiliar a 40. Se usó un gas de colisión de 10. En la Tabla 4, se presentan los datos de las transiciones del monitoreo de múltiples reacciones (MRM) para los péptidos de cambio de marco y sus correspondientes patrones internos. El tiempo de permanencia se fijó en 50 ms para cada transición del MRM, y se aplicó el mismo potencial de entrada de 10 V. Ambas resoluciones Q1 y Q3 se fijaron en la unidad. La cuantificación se realizó usando Intelliquan basado en el área del pico.

Tabla 4. Transiciones del monitoreo de múltiples reacciones (MRM) para los péptidos de cambio de marco y sus correspondientes patrones internos

Péptido sustituto	Secuencia peptídica	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	CE	CXP
FSP8	TTPPVLDSDGSFFLYSK	938.0 (2+)	836,7 (y15, 2+)	90	40	25
FSP4	VVSVLTVLHQDWLNGK	603.5 (3+)	712,8 (y12, 2+)	60	25	20
FSP5	FNWYVDGVEVHNAK	560.2 (3+)	709,3 (y12, 2+)	95	22	22
FSP3	TPEVTcWVDVSHEDPEVK	714.0 (3+)	472,2 (y4)	75	38	12
FSP8 IS	TTPPVLDSDGSFFL*YSK	941.5 (2+)	840,0 (y15, 2+)	90	40	25
FSP4 IS	VVSVLTVLHQDWL*NGK	605.8 (3+)	716,3 (y12, 2+)	60	25	20
FSP5 IS	FNWYVDGVEV*HNAK	5622 (3+)	712,3 (y12, 2+)	95	22	22
FSP3 IS	TPEVTcWVDVSHEDPEV*K	716.0 (3+)	478,2 (y4)	75	38	12

La "c" minúscula indica el resto de cisteína que ha sido alquilado con yodoacetamida.

* indica aminoácido que contiene el marcado con isótopos estables de ¹³C₅ y ¹⁵N₁.

El método de calificación se realizó usando trastuzumab como modelo. Los patrones de calibración se prepararon mediante la adición de trastuzumab a plasma de mono cynomolgus o plasma de rata Sprague-Dawley a 1,00, 1,75,

3,00, 10,0, 25,0, 75,0, 200 y 250 µg/ml. Se prepararon controles de calidad (QC) a 1,00 (LLOQ), 2,50 (LQC), 15,0 (MQC) y 190 µg/ml (UQC) de trastuzumab en plasma. Además, se incluyó un QC de dilución de 1.000 µg/ml de concentración original con el factor de dilución x 10. Las QC intraensayo se prepararon en 6 repeticiones y la QC de dilución en 3 repeticiones. Los datos de la calificación del método se presentan en la Tabla 5. Los datos indican que el ensayo de LC-MS/MS tiene buena precisión y exactitud con valores dentro de los criterios de aceptación predefinidos.

5

Tabla 5 Método de calificación de precisión y exactitud para trastuzumab en plasma de rata

QC	LLOQ 1,00	LQC 2,50	MQC 15,0	UQC 190	Dil10 QC 1000
1	1,01	2,42	14,2	206	996
2	1,07	2,48	15,1	203	984
3	1,03	2,43	14,7	191	1050
4	1,05	2,51	15,3	187	n/d
5	1,12	2,76	14,8	186	n/d
6	1,08	2,40	14,5	183	n/d
Media	1,06	2,50	14,8	193	1010
DE	0,0375	0,135	0,391	9,61	34,3
% CV	3,5	5,4	2,7	5,0	3,4
% teórico	106,0	100,0	98,5	101,4	100,9
% error sistémico	6,0	0,0	-1,5	1,4	0,9

10 La Figura 17a muestra la detección de 1 µg/ml (LLOQ) de anticuerpo trastuzumab en plasma de rata usando FSP8 como sustituto, con patrón interno de FSP8 marcado con isótopos estables (Figura 17b) detectado en el mismo tiempo de retención. Las muestras se prepararon de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 4. Se demostró buena linealidad de 1 a 250 µg/ml de trastuzumab en plasma de rata en la Figura 18.

15 La Figura 20 muestra los perfiles de tiempo y concentración individuales de ratas (1A, 1B, 1C) que recibieron un bolo de 2 mg/kg de trastuzumab, un mAb anti-HER2. Las muestras de plasma durante 28 horas después de la dosis se analizaron mediante ensayos de LC-MS/MS (Figura 19b) y ELISA (Figura 19a). Se observó una buena concordancia entre los dos métodos de ensayo. Los parámetros PK de la Figura 20 son:

trastuzumab - Parámetros PK Media ± DE ^a			
Ensayo	CL (ml/d/kg)	V0 (ml/kg)	T1/2 (d)
ELISA	6,45	41,6	9,77
LC-MS/MS	7,04	43,7	11,0

^aparámetros PK basados en n = 2 debido a probable ATA (DE no incluida)

20 La Figura 21 muestra los perfiles de tiempo y concentración individuales de las ratas (2D, 2E, 2F) que recibieron un bolo de 2 mg/kg de 3A5, un mAb anti-MUC 16. Las muestras de plasma durante 28 horas después de la dosis se analizaron mediante ensayos de LC-MS/MS (Figura 19b) y ELISA (Figura 19a). Se observó una buena concordancia entre los dos métodos. Los parámetros PK de la Figura 21 son:

25

Muc 16 - Parámetros PK Media ± DE			
Ensayo	CL (ml/d/kg)	V0 (ml/kg)	T1/2 (d)
ELISA	8,25 ± 4,03	38,0 ± 1,83	8,61 ± 3,77
LCMS	8,14 ± 3,09	42,6 ± 15,1	8,09 ± 3,26

La Figura 22 muestra los resultados de ratas (3G, 3H, 3I) que recibieron un bolo de 2 mg/kg de un mAb anti-mesotelina (Msln). Las muestras de plasma durante 28 horas después de la dosis se analizaron mediante ensayos de LC-MS/MS (Figura 19b) y ELISA (Figura 19a). Se observó una buena concordancia entre los dos métodos. Los parámetros PK de la Figura 22 son los siguientes:

30

Grupo 3 Msln - Parámetros PK Media ± DE			
Ensayo	CL (ml/d/kg)	V0 (ml/kg)	T1/2 (d)
ELISA	5,38 ± 0,975	50,2 ± 2,10	11,6 ± 4,37
LCMS	6,51 ± 0,896	47,1 ± 3,30	11,8 ± 1,94

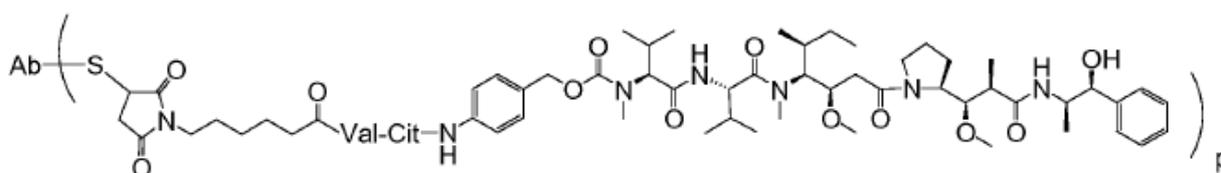
- 5 La Figura 23 muestra la concordancia entre el ensayo de LC-MS/MS mostrado en la Figura 19b y el ensayo de ELISA de la Figura 19a basado en la farmacocinética media (PK) de las muestras de plasma/suero de mono cynomolgus que recibió 3A5, un mAb anti-MUC 16 mediante la medición del anticuerpo en sangre durante 28 días. Los parámetros PK de la Figura 23 son:

Ensayo	CL (ml/d/kg)	Cmáx (µg/ml)	T _{1/2} (d)
ELISA	7,86 ± 2,75	32,0 ± 2,25	7,97 ± 2,72
LC-MS/MS	7,63 ± 2,64	31,6 ± 1,46	6,99 ± 2,97
Todos los valores son la media ± desviación estándar (DE)			

- 10 La Figura 24 muestra la concordancia entre el ensayo de LC-MS/MS mostrado en la Figura 19b y el ensayo de ELISA de la Figura 19a basado en la farmacocinética media (PK) de las muestras de plasma/suero de mono cynomolgus que recibió un mAb anti-mesotelina (Msln) mediante la medición del anticuerpo en sangre durante 42 días. Los parámetros PK de la Figura 24 son:

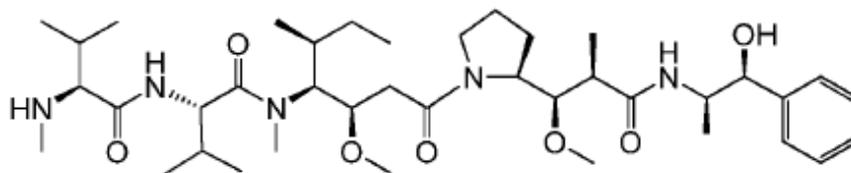
Ensayo	CL (ml/d/kg)	Cmáx (µg/ml)	T _{1/2} (d)
ELISA	4,41 ± 0,773	24,8 ± 4,63	9,51 ± 2,68
LC-MS/MS	4,26 ± 0,848	25,4 ± 4,78	11,2 ± 3,52
Todos los valores son la media ± desviación estándar (DE)			

- 15 La Figura 25 muestra la concordancia entre el ensayo de LC-MS/MS mostrado en la Figura 19b y el ensayo de ELISA de la Figura 19a basado en la farmacocinética (PK) individual de las muestras de plasma/suero de ratones (A, B, C) que recibieron un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), anti-LY6E-MC-vc-PAB-MMAE, que tiene la estructura:



- 20 en la que Ab es un anticuerpo anti-LY6E unido a través de un aminoácido de cisteína al grupo maleimidocaproilo (MC) del enlazador, y p es el número de restos de fármaco (MMAE) por anticuerpo en una molécula de ADC. El intervalo de p en una mezcla típica de ADC es de aproximadamente 0 a aproximadamente 20, o de 0 a aproximadamente 8. Cuando p es 0, puede estar presente una cierta cantidad de anticuerpo desnudo, no conjugado. La carga media de fármaco por anticuerpo puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4. Así pues, una preparación típica de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) es una mezcla heterogénea de especies con anticuerpos conjugados con cierto número de restos de fármaco, tales como MMAE. El enlazador también incluye una unidad de dipéptido de valina-citrulina (Val-Cit) susceptible al reconocimiento por la cathepsina y la unidad de para-aminobenciloximetilo (PAB) (documento US 7659241; documento US 7498298; Doronina *et al.* (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124; y Doronina *et al.* (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784).

- 35 El resto farmacológico MMAE (vedotina, (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida, n.º de registro CAS 474645-27-7) es un análogo de monometilauristatina de dolastatina (documento US 5635483, documento US 5780588) ligado a través de su extremo N-terminal al anticuerpo. MMAE tiene la estructura:



MMAE

5 Los perfiles y parámetros de PK de los dos métodos de ensayo (LC-MS/MS y ELISA) del experimento de administración de anticuerpo de las Figuras 23-28 muestran una alta concordancia, lo que indica que la cuantificación de los mAb en animales, incluyendo monos cynomolgus, ratas y ratones, mediante un solo ensayo genérico de LC-MS/MS usando péptidos de cambio de marco comunes como sustitutos es factible y tiene un alto rendimiento. La metodología basada solo en MS es capaz de generar datos de PK fiables que, de otra manera, requieren múltiples ensayos de ELISA. Además, la metodología de MS no requiere ningún reactivo personalizado, lo que puede ayudar a acelerar el proceso de desarrollo de métodos y hacer que la evaluación PK esté disponible en las primeras etapas del desarrollo de fármacos.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

15 Se establecieron curvas de calibración en la metodología de inmunoprecipitación para: DWYIHWVR (SEQ ID NO:9), FSP3, FSP4, FSP5, FSP8 (todos tanto para mono como para rata) y NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 10) (solo rata), y en la metodología de digestión de plasma entero/SPE para: FSP4, FSP5, FSP8 (todos tanto para mono como para rata). Se establecieron datos de especificidad para las muestras de plasma en blanco y con adiciones. Las proporciones de área y los correspondientes CV (coeficiente de variación) para diferentes péptidos con respecto a FSP8 (candidato para la cuantificación primaria) se han proporcionado como un indicador de la reproducibilidad de la digestión. Se usó una regresión cuadrática (1/conc.², ponderada) para ajustar los datos.

25 En la metodología de digestión de plasma entero/SPE para el tratamiento de muestras de plasma de mono (Ejemplo 3b), FSP8 es el péptido más sensible. La Figura 13 muestra los cromatogramas de LC-MS/MS que demuestran la detección de FSP8 añadido en el plasma de mono cynomolgus heparinizado con litio a LLOQ (límite inferior de cuantificación) = 1 µg/ml tras la preparación de las muestras de digestión de plasma entero/SPE. Los picos a 4,47 y 5,20 minutos están en el blanco. FSP8 tiene un tiempo de retención en 4,66 minutos. Los únicos otros péptidos cuantificables a bajas concentraciones son FSP4 y FSP5. Sin embargo, su relación señal-ruido (s/n) al nivel de LLOQ de 1 µg/ml es inferior a (<) 5. Como era de esperar, el péptido NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 10) mostró altos niveles de fondo endógenos en todo el plasma de mono. Nueve de los diez lotes individuales ensayados resultaron tener una especificidad similar y aceptable. El lote n.º 5 resultó tener un nivel de fondo inusual para todos los péptidos cuantificables. El patrón sugiere que podría estar contaminado con algo de plasma humano. En general, las muestras de FSP (es decir, en adiciones) mostraron una buena exactitud y precisión para todos los lotes para FSP8, el posible péptido de cambio de marco para la cuantificación principal (excepción: FSP7 con un CV del 27 %). Las proporciones de área de pico de FSP4 y FSP5 en comparación con FSP8 mostraron CV inferiores al 20 % a través de diferentes muestras y tipos de muestras.

40 En la metodología de digestión de plasma entero/SPE para el tratamiento de las muestras de plasma de rata (Ejemplo 3b), FSP8 es el péptido más intenso. Los otros péptidos cuantificables a concentraciones de bajo nivel son FSP4 y FSP5. Sin embargo, la s/n para estos péptidos al nivel LLOQ es inferior a 5. Las curvas de calibración mostraron una naturaleza de división, posiblemente debido a la supresión de la señal de las muestras inyectadas más tarde. Ninguno de los lotes individuales ensayados, tuvo picos de fondo cuantificables para todos los péptidos. Debido a la curva de división, las muestras de FSP mostraron valores de exactitud y precisión muy variables. Las proporciones de área de pico de FSP4 y FSP5 con respecto a FSP8 mostraron CV superiores al 20 % en la mayoría de los casos, señalando de nuevo la variabilidad del ensayo.

45 En la metodología de inmunoprecipitación para el tratamiento de muestras de plasma de mono (Ejemplo 4), FSP8 es el péptido más sensible, es decir, intenso. El resto de péptidos también son cuantificables a concentraciones de bajo nivel. La s/n para el resto de péptidos al nivel LLOQ es superior a 5 (a excepción de FSP2). Como era de esperar, el péptido NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 10) mostró niveles de fondo para todas las muestras de plasma de mono. La relación entre la concentración y la respuesta mostró cierta linealidad a altas concentraciones, posibilidad debida a la saturación de las perlas magnéticas recubiertas de Proteína A y/o la competencia con las IgG de mono cynomolgus endógenas. De los 10 lotes individuales analizados, las muestras del Lote n.º 5 resultaron tener picos de fondo para todos los péptidos cuantificables a un nivel similar, excepto para el péptido de la región variable DTYIHWVR (SEQ ID NO: 9). En general, las muestras de FSP mostraron una buena exactitud y precisión para todos los lotes para FSP8, (incluyendo el Lote n.º 5 si se tiene en cuenta la concentración de fondo en el blanco). Las proporciones de área de pico de casi todos los péptidos mostraron CV inferiores al 15 % a través de muestras y tipos de muestras diferentes (a excepción de FSP5 con un CV de CALS del aproximadamente 23 %).

En la metodología de inmunoprecipitación (IP) para el tratamiento de las muestras de plasma de rata (Ejemplo 4), FSP8 es el péptido más intenso. El resto de péptidos también son cuantificables a concentraciones de bajo nivel. La s/n para el resto de péptidos al nivel LLOQ es superior a 5 (a excepción de FSP2). La relación entre la concentración y la respuesta mostró una mejor linealidad que los datos de inmunoprecipitación (IP) de mono, posibilidad debida a la menor competencia de las IgG endógenas de menor afinidad en el plasma de rata. Ninguno de los lotes individuales ensayado, tuvo picos de fondo cuantificables para todos los péptidos. En general, las muestras de FSP mostraron una buena exactitud y precisión para todos los lotes para FSP8. Las proporciones de área de pico de casi todos los péptidos mostraron CV inferiores al 20 % a través de diferentes muestras y tipos de muestras (a excepción de FSP5 y FSP2 con un CV de CALS superior al (>) 24 %).

La extracción por inmunoprecipitación (IP) con perlas magnéticas recubiertas con Proteína A mostró mejor sensibilidad y reproducibilidad que la extracción mediante digestión de plasma entero/SPE. La metodología de IP fue más rápida y "más limpia" que la metodología de digestión de matriz entera/SPE.

15 Ejemplos

Ejemplo 1. Procedimiento simple de digestión y extracción de plasma entero

1. Alícuota de 10 µl de (citrato de sodio) plasma a una placa de unión a lo.
2. Se añaden 95 µl de una solución de DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 50 mM.
3. Se mezcla y se incuba a 60 °C durante 60 minutos.
4. Se añaden 20 µl de yodoacetamida 100 mM (IAA) en bicarbonato de amonio 50 mM.
5. Se incuba a oscuras a temperatura ambiente durante 30 minutos.
6. Se deja bajo la luz durante 20 minutos.
7. Se añaden 15 µl de solución de tripsina a 500 µg/ml en bicarbonato de amonio 50 mM.
8. Se incuba durante la noche a 37 °C.
9. Se añaden 15 µl de una solución de ácido fórmico al 1 %. Se mezcla y se centrifuga.
10. Se analiza mediante LC-MS/MS (inyección de 20 µl, UPLC a 0,7 ml/min).

Ejemplo 2. Protocolo de extracción en fase sólida para placa MAX/WCX microElution® (Waters Corp.)

1. Se mezclan 600 µl de suero/plasma digerido con 100 µl de H₃PO₄ al 8 %.
2. Se acondiciona la placa de SPE MAX/WCX µElution (Waters Corp., Milford MA) con 200 µl de MeOH.
3. Se equilibra la placa de SPE MAX/WCX µElution con 200 µl de H₂O.
4. Se carga el suero/plasma digerido diluido en la placa de SPE MAX/WCX µElution (2 alícuotas de 350 µl). Se aplica solo el vacío suficiente tras cada adición para permitir que la muestra pase a través del lecho gota a gota.
5. Se lava con 200 µl de NH₄OH al 5 %.
6. Se lava con 200 µl de ACN al 20 % (acetonitrilo).
7. Se eluye bajo un vacío moderado con (2 x 25 µl) de acetonitrilo/agua/TFA 75:25:1, v/v/v a una placa de polipropileno, de fondo cónico, de pocillos cuadrados, de 2,0 ml, de 96 posiciones.
8. Se añaden 200 µl de agua y se sella la placa con una malla sellante morada y se agita con formación de vórtice durante aproximadamente 30 s.
9. Se inyectan 25 µl en el sistema de LC/MS/MS 4000 QTRAP® (AB Sciex, Foster City, CA, EE.UU.).

Ejemplo 3a. Procedimiento de digestión de plasma entero n.º 1

1. Alícuota de 10 µl de plasma a una placa de unión a lo.
2. Se añaden 95 µl de a solución de DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 50 mM.
3. Se mezcla y se incuba a 60 °C durante 60 minutos.
4. Se añaden 20 µl de yodoacetamida 100 mM en bicarbonato de amonio 50 mM.
5. Se incuba a oscuras a temperatura ambiente durante 30 minutos.
6. Se deja bajo la luz durante 20 minutos.
7. Se añaden 15 µl de solución de tripsina a 500 µg/ml en bicarbonato de amonio 50 mM.
8. Se incuba durante la noche a 37 °C.
9. Se añaden 15 µl de una solución de ácido fórmico al 1 %. Se mezcla y se centrifuga.
10. Se analiza mediante LC-MS/MS.

Ejemplo 3b. Digestión de plasma entero/SPE (extracción en fase sólida) - Protocolo n.º 2

1. Se mezclan 25 µl de muestra de plasma con 100 µl de solución de tensioactivo SF RapiGest™ (Waters Corp., Milford MA) (0,05:40:10 RapiGest™/Acetato de amino, 50 mM/ACN, p/v/v). Se añaden 400 µl más de diluyente RapiGest™ (acetato de amonio, 50 mM/ACN 80:20, v/v).
2. Se añaden 10 µl de DTT (1 M). Se incuba a 60 °C durante aproximadamente 1 hora.
3. Se añaden 25 µl de IAA (1M). Se incuba a TA durante aproximadamente 0,5 horas protegido de la luz.
4. Se añaden 20 µg de tripsina. Se incuba a 37 °C durante aproximadamente 16 horas.
5. Se añada otra dosis de 20 µg de tripsina. Se incuba a 37 °C durante aproximadamente 4 horas.

6. Se añaden 50 µl de HCl 6 M. Se incuba a 37 °C durante aproximadamente 0,5 horas.
7. Se someten 500 µl de plasma entero digerido a SPE usando la placa MAX µElution Oasis® ((Waters Corp., Milford MA)).
8. Se mezclan 500 µl de plasma digerido con 100 µl de H₃PO₄ al 8 %.
- 5 9. Se acondiciona la placa de SPE MAX µElution Oasis® con 200 µl de MeOH.
10. Se equilibra la placa de SPE MAX µElution Oasis® con 200 µl de H₂O.
11. Se carga el plasma digerido diluido en la placa de SPE MAX µElution Oasis® (2 alícuotas de 350 µl). Se aplica solo el vacío suficiente tras cada adición para permitir que la muestra pase a través del lecho gota a gota.
12. Se lava con 200 µl de NH₄OH al 5 %.
- 10 13. Se lava con 200 µl de acetonitrilo al 20 %.
14. Se eluye bajo un vacío moderado con (2 x 25 µl) de acetonitrilo/agua/TFA 75:25:1, v/v/v.
15. Se añaden 200 µl de agua y se sella la placa. Se agita con formación de vórtice durante aproximadamente 30 s.
16. El volumen final del material eluido de SPE es de aproximadamente 250 µl. Se inyectan 25 µl de este extracto directamente.

Ejemplo 4. Protocolo de inmunoprecipitación

1. Se mezcla suavemente la suspensión perlas con Proteína A de modo que todas las perlas se suspenden uniformemente.
2. Se pipetea el volumen requerido de perlas en suspensión en un tubo de polipropileno. Con la ayuda de un imán externo, se separan las perlas del tampón de almacenamiento, y se elimina suavemente el tampón de almacenamiento con una pipeta sin afectar a las perlas, (nota: se calcula el volumen de perlas necesario basado en un volumen de perlas en µl requerido por pocillo).
- 25 3. Se añade un volumen de tampón SN1 al tubo de polipropileno igual al volumen de perlas inicial. Se agita con formación de vórtice brevemente de modo que las perlas se vuelven a suspender en tampón SN1.
4. Una vez más, con la ayuda de un imán externo, se separan las perlas del tampón SN1, y se retira suavemente el tampón SN1 sin afectar a las perlas.
5. Se repiten las etapas 3-4 dos veces más.
- 30 6. Tras lavar las perlas, se vuelve a añadir un volumen de tampón SN1 igual al volumen inicial de perlas. Se agita con formación de vórtice brevemente de modo que las perlas se vuelven a suspender en tampón SN1. La solución de perlas lavada se va a preparar de nuevo cada día de uso. Se debe almacenar a 2-4 °C si no se usa en la hora posterior al lavado.
7. Se agita con formación de vórtice la muestra de plasma y se forman alícuotas de 25 µl en un tubo de microcentrifugación.
- 35 8. Se diluye la muestra de plasma con 50 µl de tampón SN1. Se agita brevemente con formación de vórtice.
9. Se distribuyen alícuotas de 25 µl de muestra de plasma diluida en una placa de microtitulación de 96 pocillos.
10. Se añaden 125 µl de tampón SN1 a cada pocillo.
- 40 11. Se añaden 25 µl de perlas con Proteína A lavadas (de la etapa 6) a cada pocillo. Es necesario asegurarse de que las perlas estén bien suspendidas en la solución antes de la adición.
12. Se cubre la placa con una película sellante adhesiva, y se agita suavemente en un agitador de placas de titulación durante aproximadamente dos horas a temperatura ambiente.
- 45 13. Usando un imán externo y un lavador de placas, se separan las perlas magnéticas y se desechan las proteínas no unidas del sobrenadante. Se lavan las perlas tres veces con tampón SN2 usando el lavador de placas. Es necesario asegurarse de que las perlas estén bien suspendidas en la solución antes de cada etapa de lavado mediante la agitación en un agitador de placas de titulación.
14. Se añaden 125 µl de solución interna de trabajo a cada pocillo a excepción de los blancos sin patrón interno. Se añaden 25 µl de diluyente de patrón interno de trabajo a los pocillos que contienen blancos sin patrón interno.
- 50 15. Se añaden 75 µl de solución RapiGest a cada pocillo.
16. Se añaden 10 µl de DTT 0,1 M a cada pocillo. Se cubre la placa con una película sellante adhesiva, y se agita suavemente en un agitador de placas de titulación durante aproximadamente 1 minuto.
17. Se incuba la placa a 60 °C en un horno previamente calentado durante aproximadamente una hora.
18. Se añaden 25 µl de IAA 0,1 M a cada pocillo. Se cubre la placa con una película sellante adhesiva, y se agita suavemente en un agitador de placas de titulación durante aproximadamente 1 minuto. Estas etapas se deben realizar protegidas de la luz. Se cubre la placa con una hoja de aluminio y se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
- 55 19. Se añaden 10 µl de solución de tripsina a cada pocillo. Se cubre la placa con una película sellante adhesiva, y se agita suavemente en un agitador de placas de titulación durante aproximadamente 1 minuto.
20. Se incuba la placa a 37 °C en una incubadora previamente calentada durante aproximadamente 90 minutos.
- 60 21. Se añaden 15 µl de HCl 2 M a cada pocillo. Se cubre la placa con una película sellante adhesiva, y se agita suavemente en un agitador de placas de titulación durante aproximadamente 1 minuto.
22. Se incuba la placa a 37 °C en una incubadora previamente calentada durante 30 min.
23. Se agita la placa suavemente en un agitador de placas de titulación durante aproximadamente 1 minuto. Usando el Tomtec, se transfiere la solución de cada pocillo a una placa con filtro Multiscreen HTS situada encima de una placa colectora de fondo cónico, de 96 pocillos.
- 65 24. Se centrifuga la combinación de placa con filtro Multiscreen HTS/placa colectora de fondo cónico, de 96

ES 2 567 276 T3

pocillos durante 5 min a 3.000 rpm para recoger el material filtrado en la placa colectora de fondo cónico, de 96 pocillos.

25. Se sella la placa colectora de fondo cónico, de 96 pocillos, con una malla de inyección amarilla y se inyecta directamente.

5 Tampón SN1: Tween 20/clorhidrato de Trizma (1 M)/cloruro de sodio (5 M)/EDTA (0,5 M)/agua/albúmina de suero bovino 0,1:5,0:3,0:0,2:91,7:0,1, v/v/v/v/p. Dicha solución se preparó mediante la combinación de 1 ml de Tween 20, 50,0 ml de clorhidrato de Trizma 1 M, 30 ml de solución de cloruro sódico 5 M, 2 ml de EDTA 0,5 M y 1.00 g de albúmina de suero bovino en un matraz volumétrico de 1 l. Luego se completa el volumen con agua y se mezcla bien para disolver la albúmina de suero bovino. Se conserva en un recipiente cerrado a 2-8 °C durante hasta un mes.

10 Tampón SN2: Clorhidrato de Trizma (1 M)/cloruro de sodio (5 M)/EDTA (0,5 M)/agua 5,0:3,0:0,2:91,8, v/v/v/v. Dicha solución se preparó mediante la combinación de 50,0 ml de clorhidrato de Trizma 1 M, 30 ml de solución de cloruro sódico 5 M y 2 ml de EDTA 0,5 M en un matraz volumétrico de 1 l. Luego se completa el volumen con agua y se mezcla bien. Se conserva en un recipiente cerrado a 2-8 °C durante hasta un mes

Método de HPLC ilustrativo n.º 1:

Automuestreador	Acquity BSM
Lavado fuerte	Acetonitrilo
Lavado débil	Acetonitrilo:agua 10:90 v/v
Modo de inyección	Bucle completo
Sistema de LC	Acquity BSM
Caudal	0,7 ml/min
Columna analítica	100 x 2,1 mm de d.i., fenilo Waters Acquity
Temperatura de la columna	Nominalmente +60 °C
Tiempo de ejecución	7,5 minutos
Fase móvil A	Acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0,2 % (v/v)
Fase móvil B	Agua que contiene ácido fórmico al 0,2 % (v/v)

20 Perfil del gradiente

Tiempo (min)	% A	% B
Inicial	15,0	85,0
3,00	17,5	82,5
3,10	22,5	77,5
6,00	27,5	72,5
6,10	95,0	5,00
6,90	95,0	5,00
7,00	15,0	85,0
7,50	15,0	85,0

Método de HPLC ilustrativo n.º 2:

25

Columna: Waters BioSuite C18 PA-A, 3 µm, 2,1 x 50 mm (Parte n.º 188002425)

Fase móvil A: Ácido fórmico/agua (0,1:100), v/v

Fase móvil B: Ácido fórmico/acetonitrilo/metanol (0,1:75:25), v/v/v

Caudal: 0,2 ml/min

Gradiente:

Tiempo	% A	% B
0,00	95,0	5,0
0,50	95,0	5,0

4,00	60,0	40,0
5,00	5,0	95,0
5,90	5,0	95,0
6,00	95,0	5,0
7,00	95,0	5,0

5 Condiciones de MS/MS

Espectrómetro de masas	Applied Biosystems API5500
Ionización/Interfaz	TurbolonSpray™
Temperatura fuente	550 °C
GS1	344,74 kPa (50 psi)
GS2	344,74 kPa (50 psi)
Configuración del gas de cortina	206,85 kPa (30 psi)
Configuración del gas de colisión	Media
Tensión de pulverización de iones	5500 V

Aunque la invención anterior se haya descrito en cierto detalle a modo ilustrativo y de ejemplo para mayor claridad, las descripciones y los ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

10

Listado de Secuencias

<110> GENENTECH, INC. *et al.*

15

<120> MÉTODO DE LC-MS/MS DE MONITOREO DE MÚLTIPLES REACCIONES PARA DETECTAR ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS EN MUESTRAS DE ANIMALES USANDO PÉPTIDOS DE CAMBIO DE MARCO

20

<130> P4615R1-WO

<141> 11-05-2012

<150> US 61/485.249

<151> 12-05-2011

25

<160> 29

<210> 1

<211> 12

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

35

<400> 1

ES 2 567 276 T3

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

5 <210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia sintetizada
 <400> 2

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 1 5 10

15 <210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia sintetizada
 <400> 3

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 1 5 10 15

25 **Pro Glu Val Lys**

30 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada
 35 <400> 4

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 1 5 10

40 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> secuencia sintetizada
 <400> 5

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 1 5 10 15

Lys

50 <210> 6

ES 2 567 276 T3

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 6

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 1 5

10

<210> 7
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> secuencia sintetizada

20

<400> 7

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 20

25

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 8

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 1 5 10 15

Ser Lys

35

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 9

45

Asp Trp Tyr Ile His Trp Val Arg
 1 5

50

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 567 276 T3

<220>
<223> secuencia sintetizada

<400> 10

5

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
1 5 10

<210> 11
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> secuencia sintetizada

15

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

ES 2 567 276 T3

				155					160					165
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				170					175					180
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				185					190					195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
				200					205					210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
				215					220					225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
				230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				245					250					255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				260					265					270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
				275					280					285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
				290					295					300
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
				305					310					315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				320					325					330
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
				335					340					345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
				350					355					360
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
				365					370					375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
				380					385					390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				395					400					405
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				410					415					420
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				425					430					435
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
				440					445					450
Gly	Lys													

<210> 12
<211> 328
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> secuencia sintetizada

10

<400> 12

ES 2 567 276 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
1				5					10					15
Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
				20					25					30
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser
				35					40					45
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				50					55					60
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				65					70					75
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Val	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
				80					85					90
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ile	Lys	Thr	Cys	Gly	Gly
				95					100					105
Gly	Ser	Lys	Pro	Pro	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
				110					115					120
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				125					130					135
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
				140					145					150
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
				155					160					165
Asn	Gly	Ala	Glu	Val	His	His	Ala	Gln	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Thr
				170					175					180
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Thr
				185					190					195
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Ser
				200					205					210
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Arg	Gln	Lys	Thr	Val	Ser	Lys	Thr
				215					220					225
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Pro
				230					235					240
Arg	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Ile
				245					250					255
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Val	Val	Glu	Trp	Ala	Ser	Asn
				260					265					270
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Thr	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp

ES 2 567 276 T3

				275						280					285
	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
				290						295					300
	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				305						310					315
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
				320						325					

5 <210> 13
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 13

ES 2 567 276 T3

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

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

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser
35 40 45

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

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
65 70 75

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Val Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
80 85 90

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ile Lys Thr Cys Gly Gly
95 100 105

Gly Ser Lys Pro Pro Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
110 115 120

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
125 130 135

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
140 145 150

Asp Val Ser Gln Glu Glu Pro Asp Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
155 160 165

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu
170 175 180

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Thr
185 190 195

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Ser
200 205 210

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Arg Gln Lys Thr Val Ser Lys Thr

ES 2 567 276 T3

				215						220					225
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Pro	
				230					235						240
Arg	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Ile	
				245					250					255	
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Val	Val	Glu	Trp	Ala	Ser	Asn	
				260					265					270	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Thr	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
				275					280					285	
Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
				290					295					300	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				305					310					315	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser			
				320					325						

<210> 14
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 14

ES 2 567 276 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
1				5					10					15
Arg	Ser	Thr	Ser	Gln	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
				20					25					30
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
				35					40					45
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				50					55					60
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				65					70					75
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Val	Cys	Asn	Val	Val	His	Glu	Pro	Ser
				80					85					90
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Gly	Leu	Pro	Cys	Arg	Ser	Thr
				95					100					105
Cys	Cys	Pro	Cys	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
				110					115					120
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				125					130					135
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro
				140					145					150
Asp	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asn	Gly	Ala	Glu	Val	His	His

ES 2 567 276 T3

				155						160					165
Ala	Gln	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Thr	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
				170					175					180	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Thr	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
				185					190					195	
Lys	Glu	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
				200					205					210	
Ile	Gln	Lys	Thr	Val	Ser	Lys	Asp	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
				215					220					225	
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	
				230					235					240	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Ile	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
				245					250					255	
Ile	Val	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Thr	Tyr	
				260					265					270	
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	
				275					280					285	
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
				290					295					300	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	
				305					310					315	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser										
				320											

- <210> 15
- <211> 321
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> secuencia sintetizada
- <400> 15

ES 2 567 276 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
1				5					10					15
Arg	Ser	Thr	Ser	Gln	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
				20					25					30
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
				35					40					45
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				50					55					60
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				65					70					75
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Val	Cys	Asn	Val	Val	His	Glu	Pro	Ser
				80					85					90
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Gly	Leu	Pro	Cys	Arg	Ser	Thr

ES 2 567 276 T3

				95						100					105
Cys	Cys	Pro	Cys	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
				110					115					120	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
				125					130					135	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Glu	Pro	
				140					145					150	
Asp	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
				155					160					165	
Ala	Gln	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
				170					175					180	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Thr	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
				185					190					195	
Lys	Glu	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
				200					205					210	
Ile	Gln	Lys	Thr	Val	Ser	Lys	Asp	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
				215					220					225	
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	
				230					235					240	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Ile	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
				245					250					255	
Ile	Val	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Thr	Tyr	
				260					265					270	
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	
				275					280					285	
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
				290					295					300	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	
				305					310					315	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser										
				320											

5 <210> 16
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 16

ES 2 567 276 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
1				5					10					15
Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
				20					25					30
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala

ES 2 567 276 T3

				35					40					45
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				50					55					60
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				65					70					75
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Val	Cys	Asn	Val	Val	His	Glu	Pro	Ser
				80					85					90
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Phe	Thr	Pro	Pro	Cys	Pro
				95					100					105
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
				110					115					120
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
				125					130					135
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Asp
				140					145					150
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asn	Gly	Ala	Glu	Val	His	Asn	Ala
				155					160					165
Gln	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
				170					175					180
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Thr	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
				185					190					195
Glu	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Arg
				200					205					210
Gln	Lys	Thr	Val	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
				215					220					225
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Pro	Arg	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln
				230					235					240
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Ile	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
				245					250					255
Val	Val	Glu	Trp	Ala	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Thr	Tyr	Lys
				260					265					270
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	Tyr
				275					280					285
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr
				290					295					300
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
				305					310					315
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser										
				320										

<210> 17
 <211> 450
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

5

<400> 17

ES 2 567 276 T3

Glu Val Gln Leu Val 5 Glu Ser Gly Gly Gly 10 Leu Val Gln Pro Gly 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser 25 Gly Phe Asn Ile Lys 30
 Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 45
 Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr 105
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 120
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser 135
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys 150
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala 165
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 180
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser 195
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser 210
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys 225
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

ES 2 567 276 T3

					290						295					300	
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp			
				305					310					315			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala			
				320					325					330			
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln			
				335					340					345			
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu			
				350					355					360			
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe			
				365					370					375			
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro			
				380					385					390			
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly			
				395					400					405			
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp			
				410					415					420			
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu			
				425					430					435			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
				440					445					450			

<210> 18
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 18

ES 2 567 276 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1          5          10          15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
          20          25          30
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
          35          40          45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
          50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
          65          70          75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
          80          85          90
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
          95          100          105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
          110          115          120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
          125          130          135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
          140          145          150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
          155          160          165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
          170          175          180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
          185          190          195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
          200          205          210

Arg Gly Glu Cys

```

<210> 19
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 19

ES 2 567 276 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1          5          10          15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
          20          25          30
Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
          35          40          45
Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
          50          55          60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
          65          70          75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
          80          85          90
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          95          100          105
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
          110          115          120
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
          125          130          135
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
          140          145          150
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
          155          160          165
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
          170          175          180
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
          185          190          195
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
          200          205          210

Gly Glu Cys

```

<210> 20
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 20

5

10

ES 2 567 276 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 110 115 120
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 125 130 135
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 140 145 150
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 155 160 165
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 170 175 180
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 185 190 195
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

ES 2 567 276 T3

				200						205				210
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
				215					220					225
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
				230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245					250					255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
				260					265					270
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
				275					280					285
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
				290					295					300
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
				305					310					315
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
				320					325					330
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
				335					340					345
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met
				350					355					360
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				365					370					375
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
				380					385					390
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
				395					400					405
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
				410					415					420
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
				425					430					435
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
				440					445					

<210> 21
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 21

ES 2 567 276 T3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20					25					30
Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				125					130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
				140					145					150
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
				155					160					165
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
				170					175					180
Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
				185					190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				200					205					210
Arg	Gly	Glu	Cys											

<210> 22
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 22

ES 2 567 276 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Asp Ser Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser

ES 2 567 276 T3

				380						385					390
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
				395					400					405	
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	
				410					415					420	
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
				425					430					435	
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
				440					445						

5 <210> 23
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 23

ES 2 567 276 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ser Gln Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Leu Pro Tyr Tyr Arg
 95 100 105
 Met Ser Lys Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 110 115 120
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 125 130 135
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 140 145 150
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 155 160 165
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 170 175 180
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 185 190 195
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 200 205 210
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 215 220 225
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

ES 2 567 276 T3

				245						250				255
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
				260					265					270
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
				275					280					285
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
				290					295					300
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				305					310					315
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
				320					325					330
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
				335					340					345
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
				350					355					360
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
				365					370					375
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
				380					385					390
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
				395					400					405
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
				410					415					420
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				425					430					435
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
				440					445					450
Pro Gly Lys														

- <210> 25
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> secuencia sintetizada

- <400> 25

ES 2 567 276 T3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Tyr	Phe	Ser
				20					25					30
Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
					50					55				60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Tyr	Leu	Gly	Ser	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				125					130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
				140					145					150
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
				155					160					165
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
				170					175					180
Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
				185					190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				200					205					210
Arg	Gly	Glu	Cys											

<210> 26
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 26

ES 2 567 276 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30
 Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45
 Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Thr Ser Gly Leu Asp Tyr

ES 2 567 276 T3

				410						415				420
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				425					430					435
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
				440					445					

<210> 27
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 27

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Asp	Leu	Ile	His
				20					25					30
Asn	Trp	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Tyr	Trp	Thr	Thr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				125					130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
				140					145					150
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
				155					160					165
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
				170					175					180
Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
				185					190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				200					205					210
Arg	Gly	Glu	Cys											

<210> 28
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> secuencia sintetizada

10

<400> 28

ES 2 567 276 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp
95 100 105
Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
110 115 120
Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
125 130 135
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
140 145 150
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
155 160 165
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
170 175 180
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
185 190 195
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
200 205 210
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp
215 220 225
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

ES 2 567 276 T3

				275					280					285
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
				290					295					300
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
				305					310					315
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
				320					325					330
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				335					340					345
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
				350					355					360
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
				365					370					375
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
				380					385					390
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
				395					400					405
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				410					415					420
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
				425					430					435
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
				440					445					450

Lys

- <210> 29
- <211> 213
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> secuencia sintetizada

- <400> 29

ES 2 567 276 T3

Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro
1				5					10					15
Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser
				20					25					30
Tyr	Ile	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro
				35					40					45
Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Val	Arg
				50					55					60
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser
				65					70					75
Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
					80					85				90
Thr	Ser	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
				95					100					105
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser
				110					115					120
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu
				125					130					135
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
				140					145					150
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln
				155					160					165
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu
				170					175					180
Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val
				185					190					195
Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
				200					205					210
Gly	Glu	Cys												

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de anticuerpos humanos o humanizados que comprende las etapas de:

- 5 (a) tratar una muestra biológica que comprende un anticuerpo humano o humanizado con una enzima digestiva para formar una muestra de anticuerpo digerida, en donde la muestra biológica es suero, plasma, tejido o células de un animal que ha sido tratado con un anticuerpo humano o humanizado; y
 (b) analizar la muestra de anticuerpo digerida por espectrometría de masas para detectar uno o más péptidos presentes en los anticuerpos humanos y no presentes en los anticuerpos animales, en donde los péptidos
 10 comprenden una o más secuencias seleccionadas entre SEQ ID NO: 1-8,

GPSVFPLAPSSK	SEQ ID NO: 1
STSGGTAALGCLVK	SEQ ID NO: 2
TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	SEQ ID NO: 3
FNWYVDGVEVHNAK	SEQ ID NO: 4
VVSVLTVLHQDWLNGK	SEQ ID NO: 5
ALPAPIEK	SEQ ID NO: 6
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	SEQ ID NO: 7
TTPPVLDSDGSFFLYSK	SEQ ID NO: 8

en donde la enzima digestiva es tripsina.

- 15 2. El método de la reivindicación 1 que comprende además poner en contacto la muestra de anticuerpo digerida con un medio de captura por afinidad o adsorbente cromatográfico, y eluir una muestra de anticuerpo digerida enriquecida.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 que comprende además poner en contacto la muestra biológica con un medio de captura por afinidad o adsorbente cromatográfico, y eluir una muestra biológica enriquecida, tratando después la muestra biológica enriquecida con la enzima digestiva.
- 25 4. El método de las reivindicaciones 2 o 3, en el que el medio de captura por afinidad es Proteína A/G soportada en perlas.
5. El método de las reivindicaciones 2 o 3, en el que el adsorbente cromatográfico es un adsorbente de extracción en fase sólida (SPE).
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es suero o plasma.
7. El método de la reivindicación 1, en el que se mide la concentración de muestra de anticuerpo digerida.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo humano o humanizado se une a uno o más antígenos asociados a tumores o receptores de superficie celular seleccionados entre (1)-(36):
- (1) BMPR1B (receptor de proteínas morfogenéticas óseas de tipo IB);
 (2) E16 (LAT1, SLC7A5);
 (3) STEAP1 (antígeno prostático epitelial de transmembrana de seis hélices);
 (4) 0772P (CA125, MUC16);
 40 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de los megacariocitos, mesotelina);
 (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTI1b, SLC34A2, familia 34 de vehículos de solutos (fosfato de sodio), miembro 2, transportador de fosfato dependiente del sodio de tipo II 3b);
 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de tromboespondina (de tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio
 45 citoplasmático corto, (semaforina) 5B);
 (8) PSCA hlg;
 (9) ETBR (receptor de endotelina de tipo B);
 (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315);
 (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de
 50 próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno prostático epitelial de transmembrana de seis hélices 2, proteína prostática de transmembrana de seis hélices);
 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptor transitorio, subfamilia

- M, miembro 4);
 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma);
 (14) CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792);
 (15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (inmunoglobulina asociada beta), B29);
 5 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína ancla de fosfatasa 1a que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C);
 (17) HER2 (ErbB2);
 (18) NCA;
 (19) MDP;
 10 (20) IL20R α ;
 (21) Brevican;
 (22) EphB2R;
 (23) ASLG659;
 (24) PSCA;
 15 (25) GEDA;
 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor 3 de BLYS, BR3);
 (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B);
 (28) CD79a (CD79A, CD79 α , inmunoglobulina asociada alfa);
 (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1);
 20 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula del MHC de clase II (antígeno Ia));
 (31) P2X5 (canal iónico 5 abierto por el ligando P2X del receptor purinérgico);
 (32) CD72 (antígeno de la diferenciación de linfocitos B CD72, Lyb-2);
 (33) LY64 (Antígeno linfocítico 64 (RP105), proteína de la membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR));
 25 (34) FcRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc);
 (35) IRTA2 (FcRH5, 2 asociada a la translocación del receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas); y
 (36) TENB2 (proteoglicano de la transmembrana putativa).
9. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo humano o humanizado se selecciona entre trastuzumab, ocrelizumab, pertuzumab, anti-PDL1, anti-neuropilina-1, anti-MUC16, rituximab, anti-mesotelina y anti-LY6E.
- 30 10. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo humano o humanizado está conjugado con un resto farmacológico.
- 35 11. El método de la reivindicación 10, en el que el resto farmacológico se selecciona entre un maitansinoide, dolastatina, auristatina, caliqueamicina, pirrolobenzodiazepina (PBD), PNU-159682, antraciclina, duocarmicina, alcaloide de vinca, taxano, tricoteceno, CC1065, duocarmicina, camptotecina, elinafida y estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados de los mismos.

CynoHC 1a D3 1	1	-----ASTKGPVFPFLAPSSR STSESTAALGCL	28
CynoHC 1b E5 1	1	-----ASTKGPVFPFLAPSSR STSESTAALGCL	28
Cyno HC 2a	1	-----ASTKGPVFPFLAPSSR STSQSTAALGCL	28
CynoHC 2b E6 1	1	-----ASTKGPVFPFLAPSSR STSQSTAALGCL	28
CynoHC 3	1	-----ASTKGPVFPFLAPSSR STSESTAALGCL	28
Hu2H7 HC	101	YYSNSYWFVDFVWGQGLTVTVSSASTKGPVFPFLAPSSK STSGGTAALGCL	150
FSP1			
(CDR)			
FSP2			
CynoHC 1a D3 1	29	VKDYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGT	78
CynoHC 1b E5 1	29	VKDYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGT	78
Cyno HC 2a	29	VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGT	78
CynoHC 2b E6 1	29	VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGT	78
CynoHC 3	29	VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGT	78
Hu2H7 HC	151	VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGT	200
FSP2			
(BISAGRA SUPERIOR)			
CynoHC 1a D3 1	79	QTYVCNVNHHKPSNTKVDKRVKIKTCGGGSKPPTCPPCPAPELLGGPSVFL	128
CynoHC 1b E5 1	79	QTYVCNVNHHKPSNTKVDKRVKIKTCGGGSKPPTCPPCPAPELLGGPSVFL	128
Cyno HC 2a	79	QTYVCNVVHEPSNTKVDKTVGLPCR-----STCCPCAPELLGGPSVFL	121
CynoHC 2b E6 1	79	QTYVCNVVHEPSNTKVDKTVGLPCR-----STCCPCAPELLGGPSVFL	121
CynoHC 3	79	QTYVCNVVHEPSNTKVDKRVKIKTCGGGSKPPTCPPCPAPELLGGPSVFL	120
Hu2H7 HC	201	QTYICNVNHHKPSNTKVDKRVKIKTCGGGSKPPTCPPCPAPELLGGPSVFL	247
CynoHC 1a D3 1	129	FPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVDSQEDPDVK FNWYVNGAEVHHAQTKPR	178
CynoHC 1b E5 1	129	FPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVDSQEDPDVK FNWYVNGAEVHHAQTKPR	178
Cyno HC 2a	122	FPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVDSQEDPDVK FNWYVNGAEVHHAQTKPR	171
CynoHC 2b E6 1	122	FPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVDSQEDPDVK FNWYVNGAEVHHAQTKPR	171
CynoHC 3	121	FPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVDSQEDPDVK FNWYVNGAEVHHAQTKPR	170
Hu2H7 HC	248	FPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVDSQEDPDVK FNWYVNGAEVHHAQTKPR	297
FSP3			
FSP4			

Figura 1

CynoHC 1a D3 1	179	ETQYNSTYRVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKVSNKALPAPRQKTVSKTKGQ	228
CynoHC 1b E5 1	179	EEQFNSTYRVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKVSNKALPAPRQKTVSKTKGQ	228
Cyno HC 2a	172	ETQYNSTYRVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKVSNKALPAPIQKTVSKDKGQ	221
CynoHC 2b E6 1	172	EEQFNSTYRVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKVSNKALPAPIQKTVSKDKGQ	221
CynoHC 3	171	EEQFNSTYRVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKVSNKALPAPRQKTVSKTKGQ	220
Hu2H7 HC	298	EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTVSKAKGQ	347
FSP5			
CynoHC 1a D3 1	229	PREPQVYTLPPPREELTKNQVSLTCLIKGFYPSDIVVEWASNGQPENTYK	278
CynoHC 1b E5 1	229	PREPQVYTLPPPREELTKNQVSLTCLIKGFYPSDIVVEWASNGQPENTYK	278
Cyno HC 2a	222	PREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLIKGFYPSDIVVEWESSGQPENTYK	271
CynoHC 2b E6 1	222	PREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLIKGFYPSDIVVEWESSGQPENTYK	271
CynoHC 3	221	PREPQVYTLPPPREELTKNQVSLTCLIKGFYPSDIVVEWASNGQPENTYK	270
Hu2H7 HC	348	PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLIKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	397
FSP7			
CynoHC 1a D3 1	279	TTPPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHHTQKSLS	328
CynoHC 1b E5 1	279	TTPPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHHTQKSLS	328
Cyno HC 2a	272	TTPPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHHTQKSLS	321
CynoHC 2b E6 1	272	TTPPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHHTQKSLS	321
CynoHC 3	271	TTPPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHHTQKSLS	320
Hu2H7 HC	398	TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHHTQKSLS	447
FSP8			

Figura 1 (continuación)

**rhuMabHER2, trastuzumab humanizado, recombinante,
Cadena pesada**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV
/
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPS
/
FSP1 / FSP2 /
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
/
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
/
FSP3 / FSP4 / FSP5 /
VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
/ FSP6 / FSP7
CKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
/ FSP8 /
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSR
SGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 2

rhuMAb 2H7, 2H7, ocrelizumab

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGLTVTVSSASTKG
FSP1 / FSP2 /
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVF
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
FSP3 / FSP4 / FSP5...../
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
/ FSP6 / FSP7....
KCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
/ FSP8 /
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Figura 3

Pertuzumab, rhuMAb 2C4, 2C4

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKG
RFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:20)

Cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:21)

Figura 4

Anti-PDL1

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKG
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:22)

Cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSITAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:23)

Figura 5

Anti-Neuropilina-a (anti-NRP1, MNRP1685A)

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSQISPAGGYTNYADSVKG
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGELPYRMSKVMDVWGQGLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO:24)

Cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQYFSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFS
SGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYLGSPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:25)

Figura 6

Anti-MUC16 3A5

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITNDYAWNWRQAPGKGLEWVGYSYSGYTTYNPSLKS
RFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWTSGLDYWGQGLVTVSSCSTKGPSVFLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO:26)

Cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASDLIHNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGATSLETGVPSRFS
SGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYWTTPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:27)

Figura 7

C2B8, anti-CD20, rituximab

Cadena pesada

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG
KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:28)

Cadena ligera

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVFVRFSGSGS
GTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:29)

Figura 8

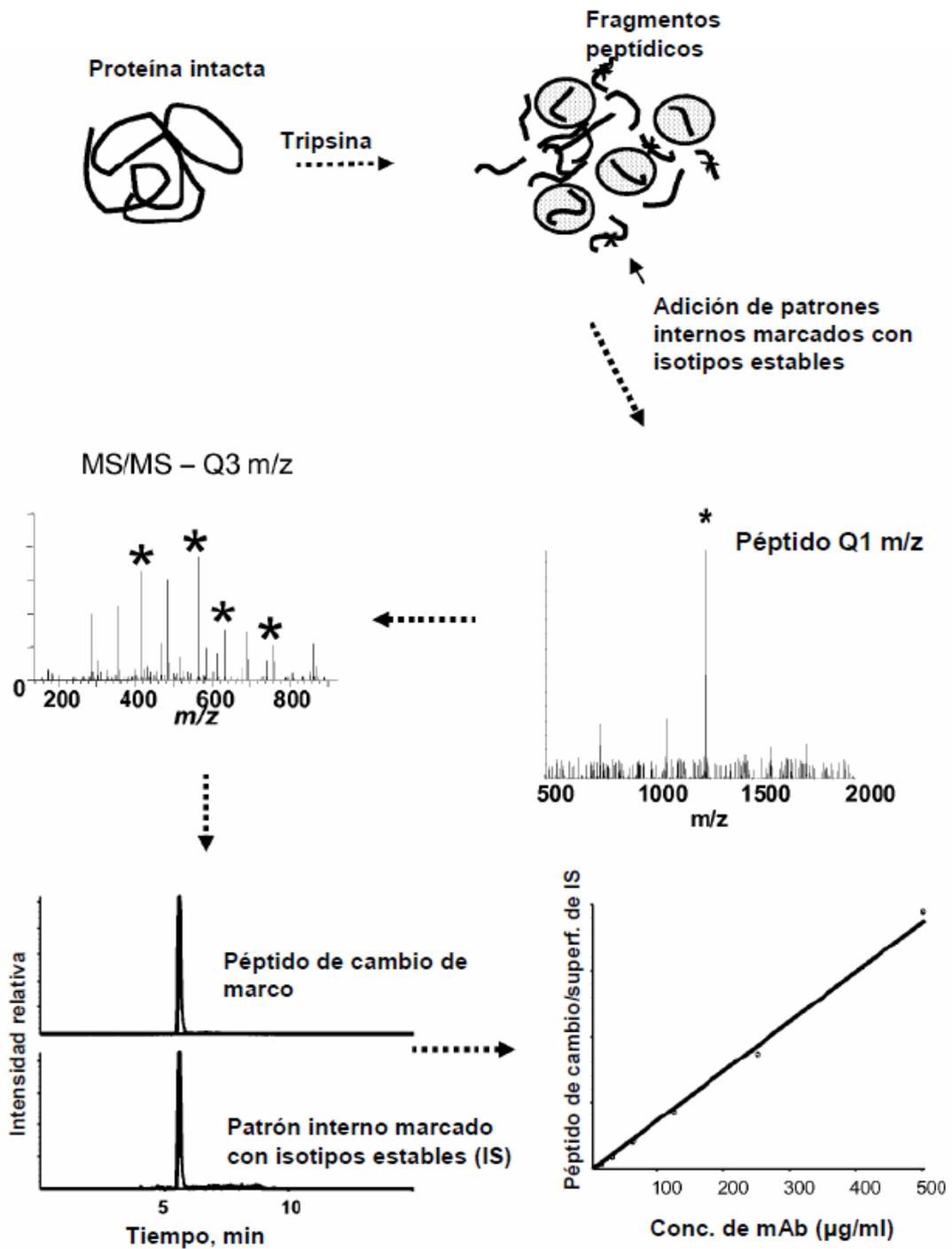


Figura 9

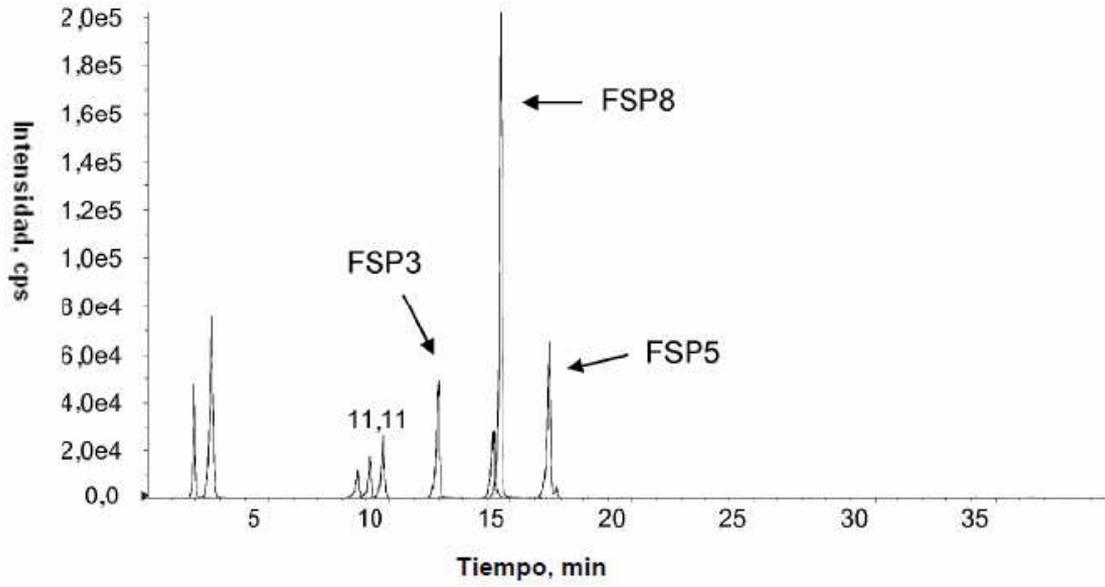


Figura 10

FSP5: VVSVLTVLHQDWLNGK

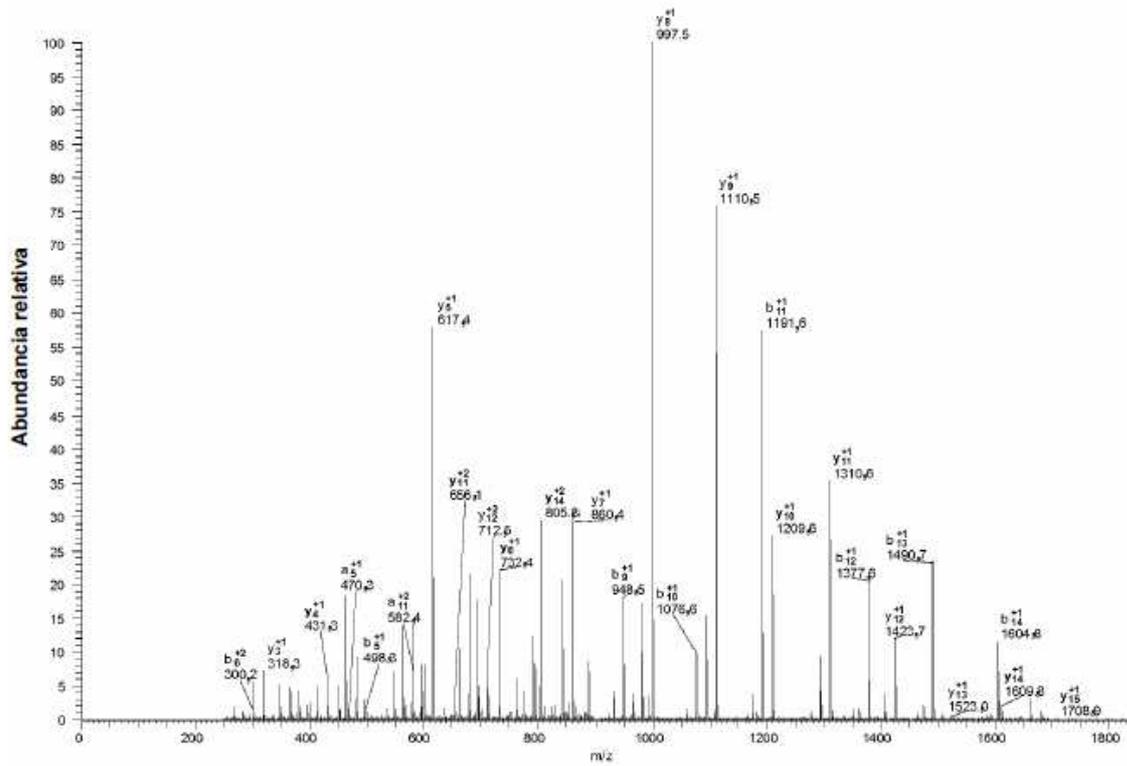


Figura 11

Curva de calibración
Plasma de mono Cynomolgus heparinizado con litio
Metodología de digestión de plasma entero/SPE
FSP8: TTPPVLDSDGSFFLYSK

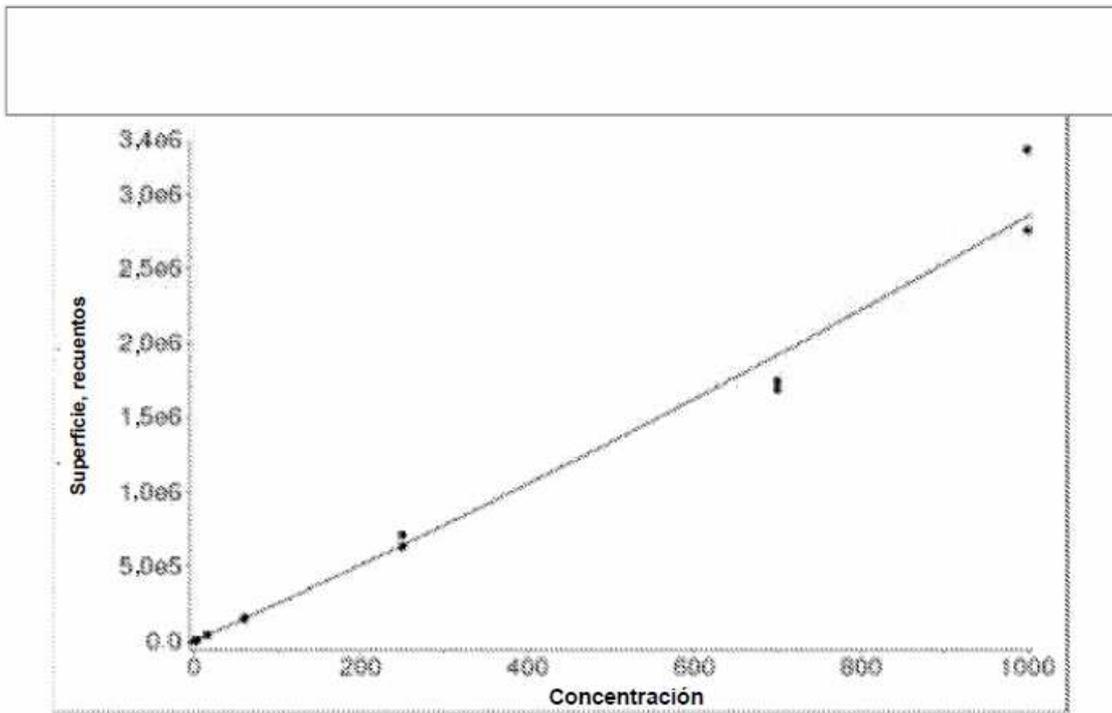


Figura 12

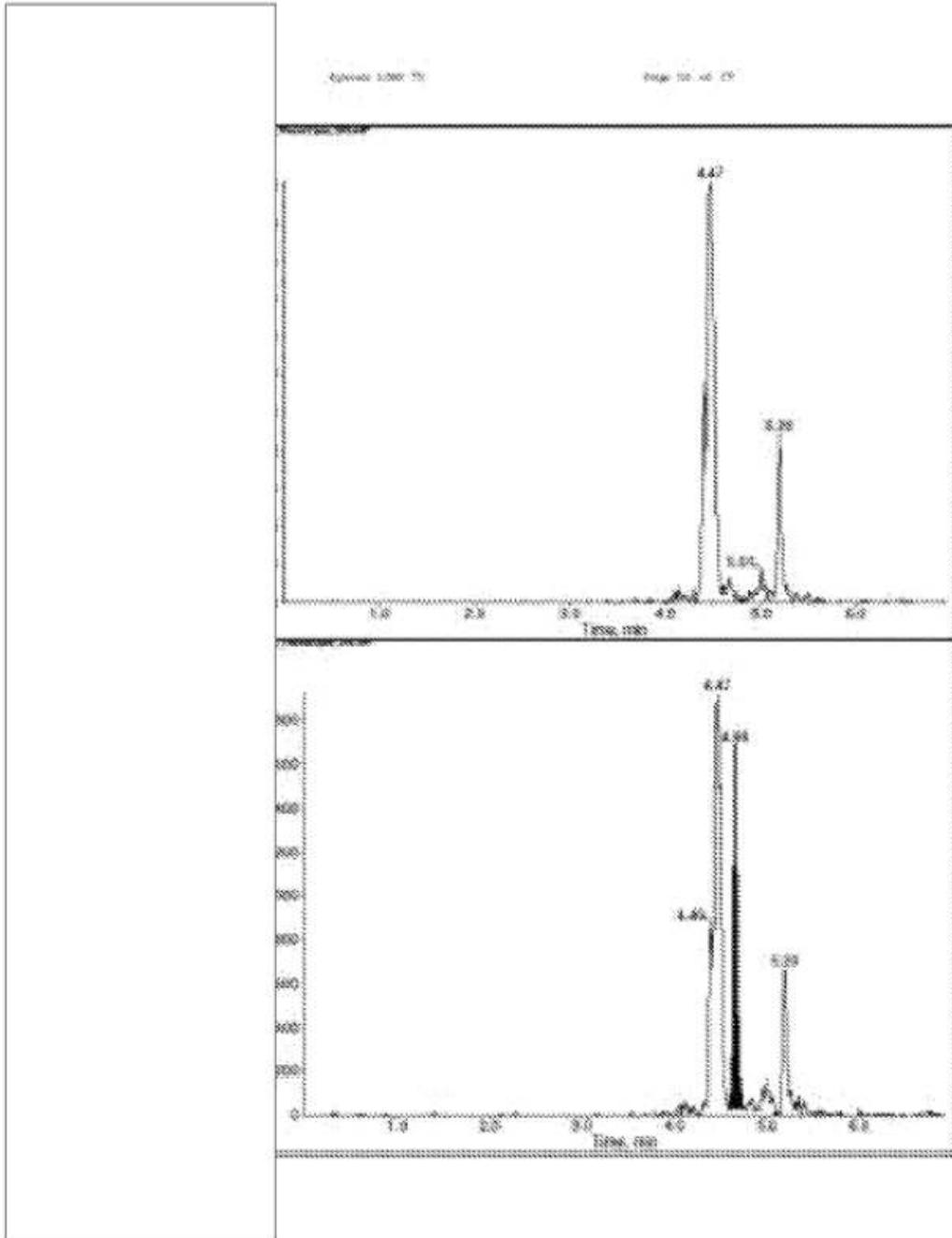


Figura 13

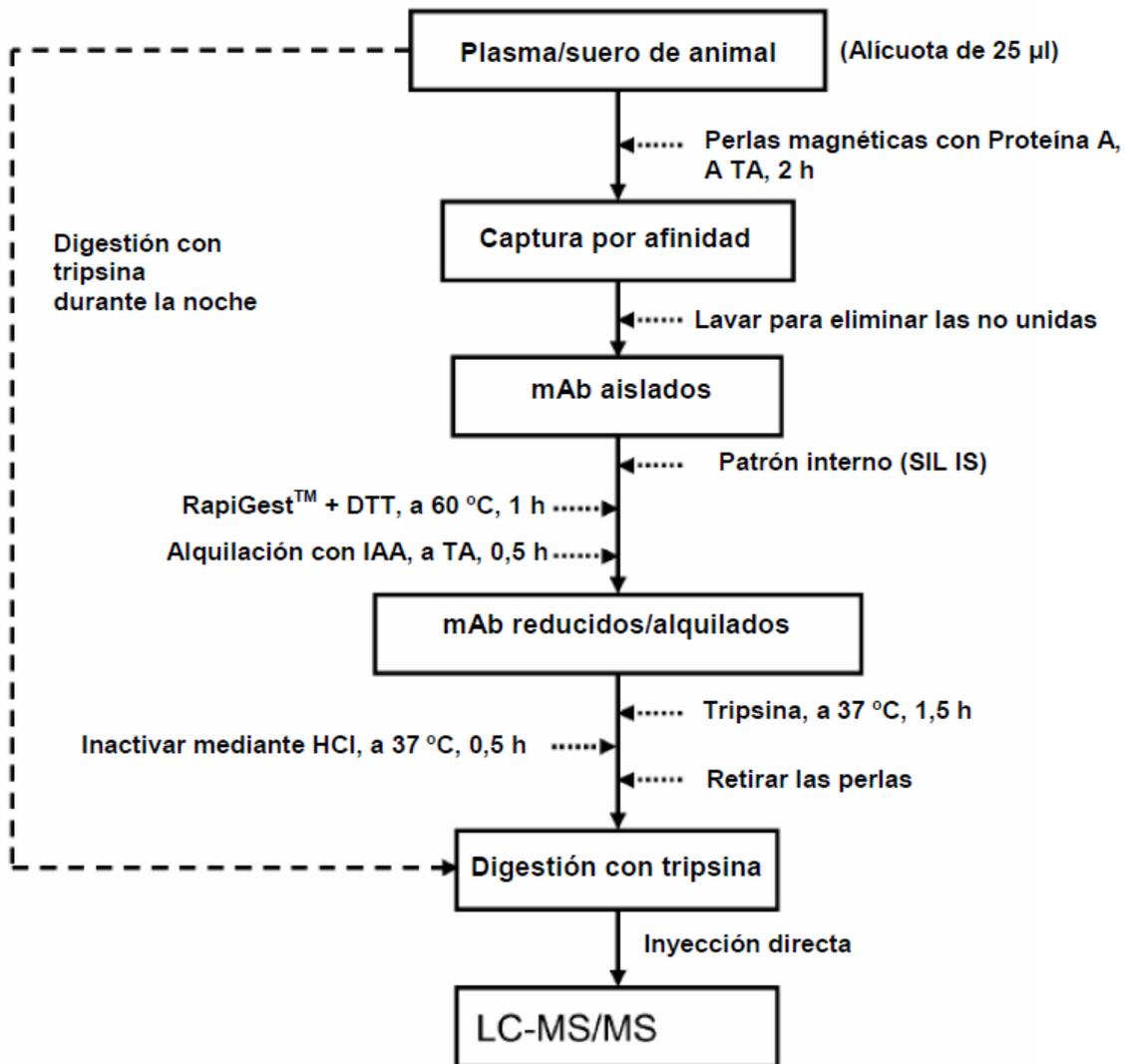


Figura 14

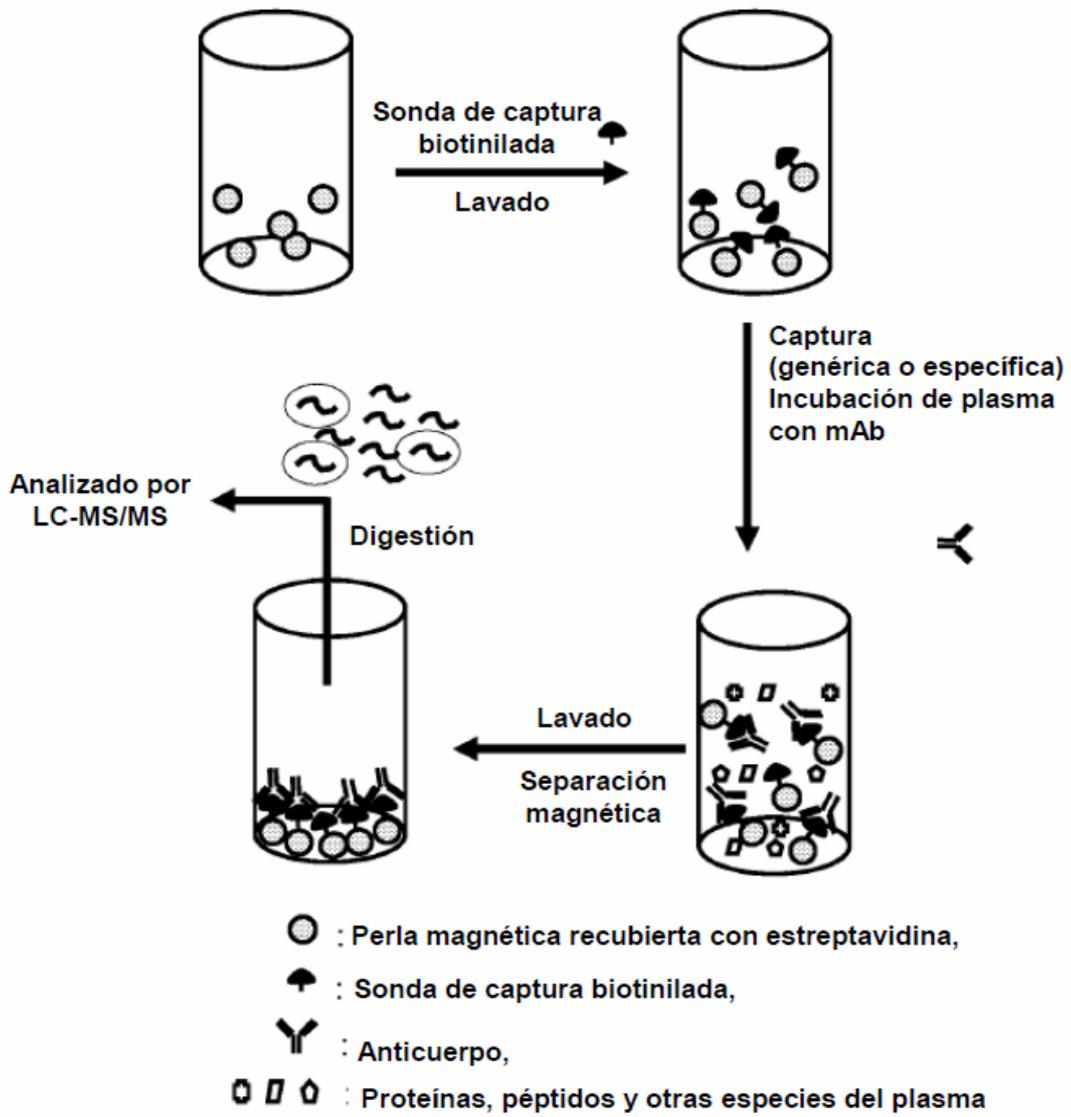
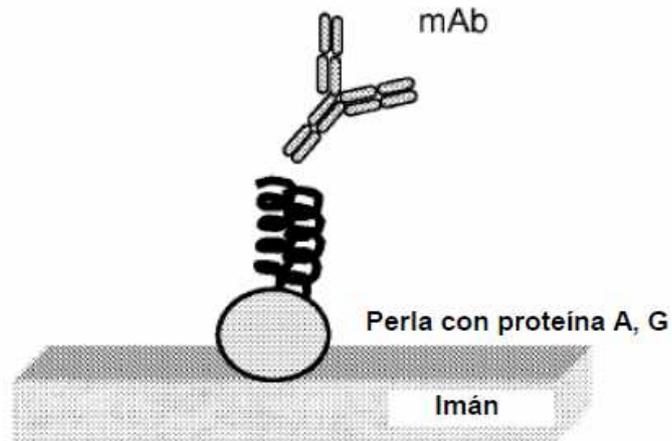


Figura 15

Captura genérica



Captura específica

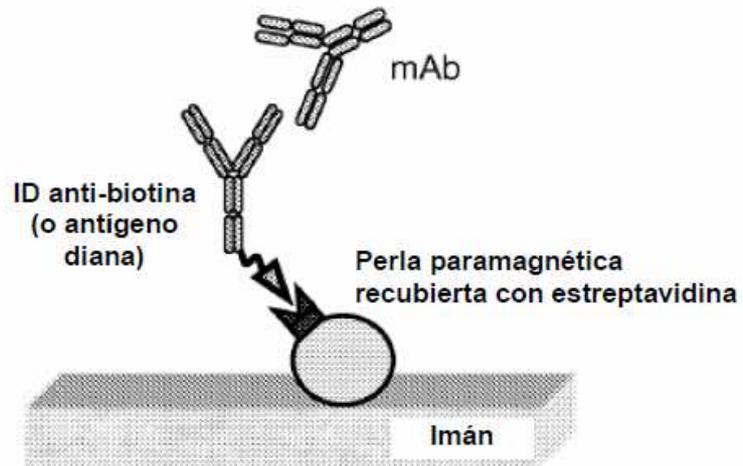


Figura 16

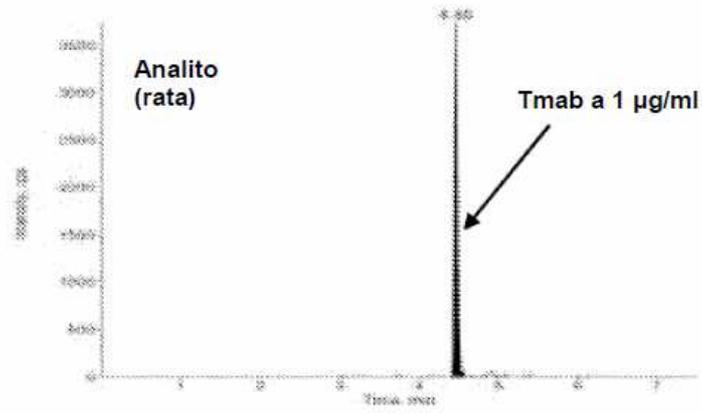


Figura 17a

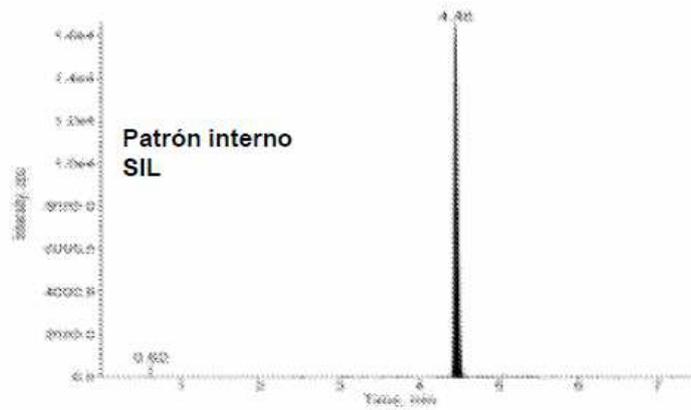


Figura 17b

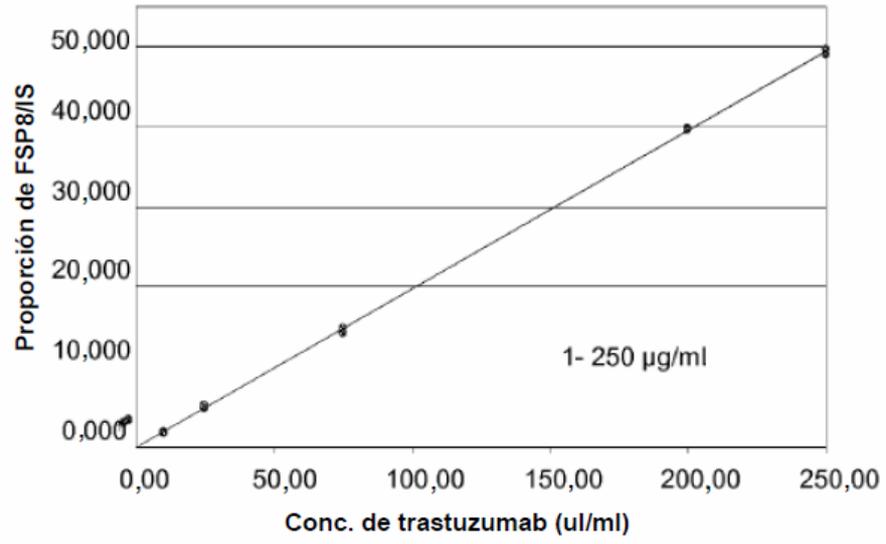


Figura 18

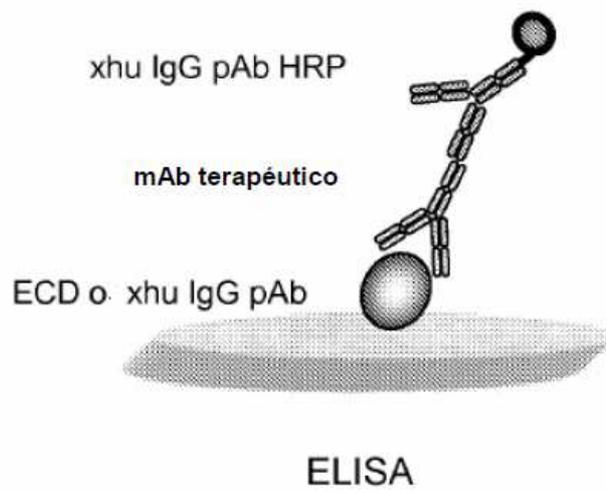


Figura 19a

Captura con perlas recubiertas de Proteína A/digestión con tripsina

Péptido de cambio de marco (FSP8):

TTPPVLDSDGSFFLYSK

Transición del MRM:

938,0 (M, 2+) → 836,7 (y15, 2+)

LC-MS/MS

Figura 19b

Anti-HER2 (trastuzumab)

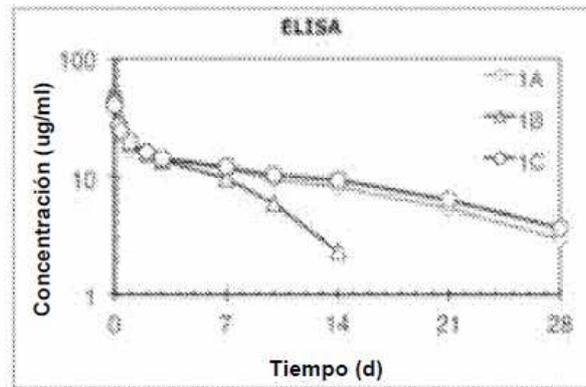
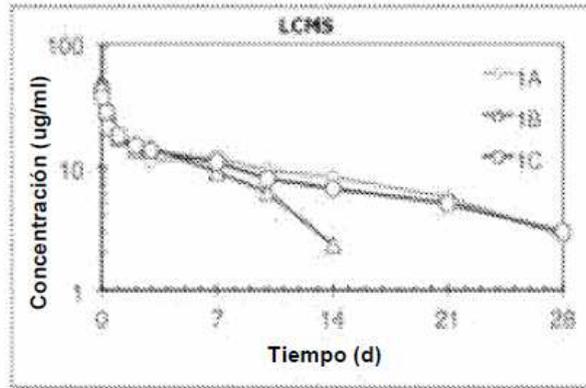


Figura 20

Anti-MUC16

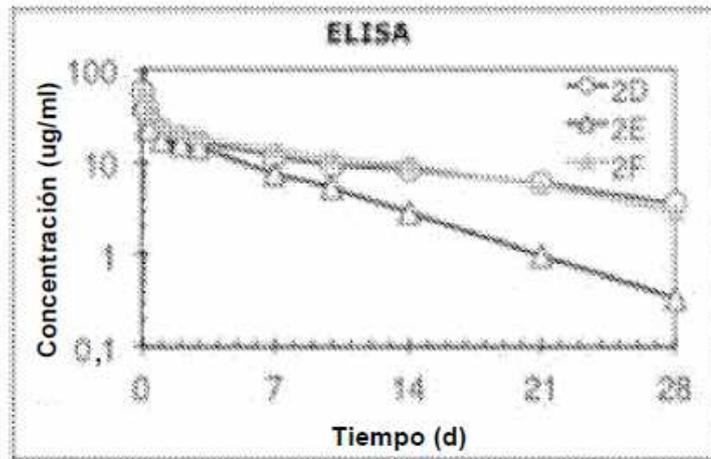
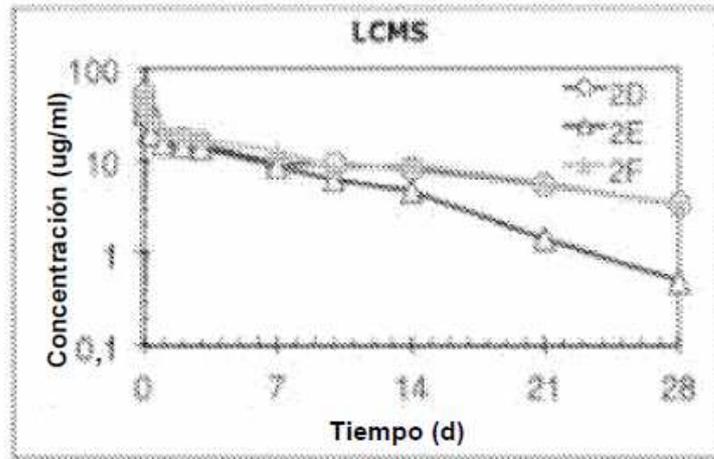


Figura 21

Anti-mesotelina

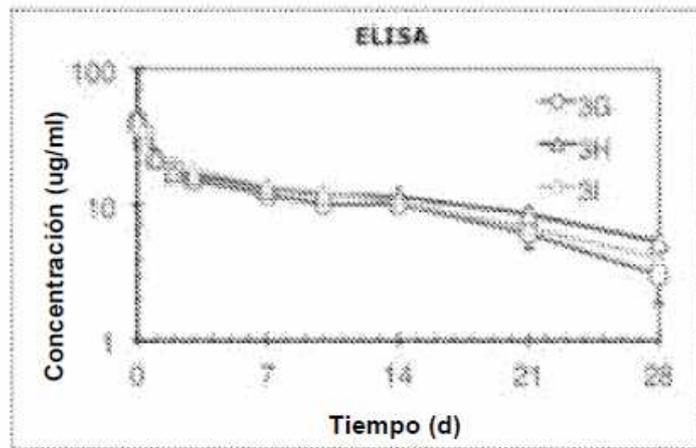
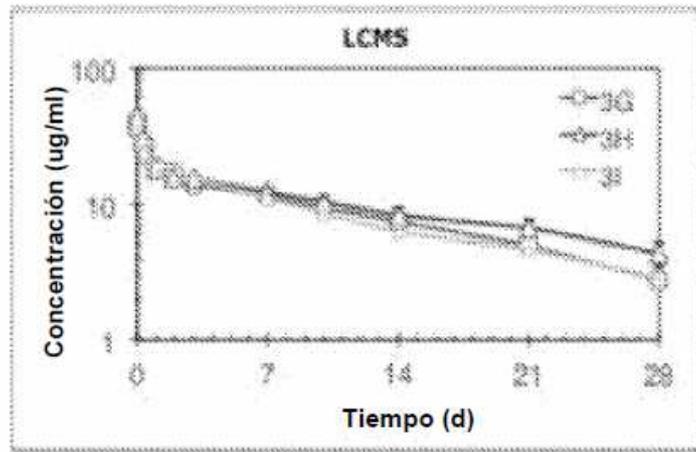


Figura 22

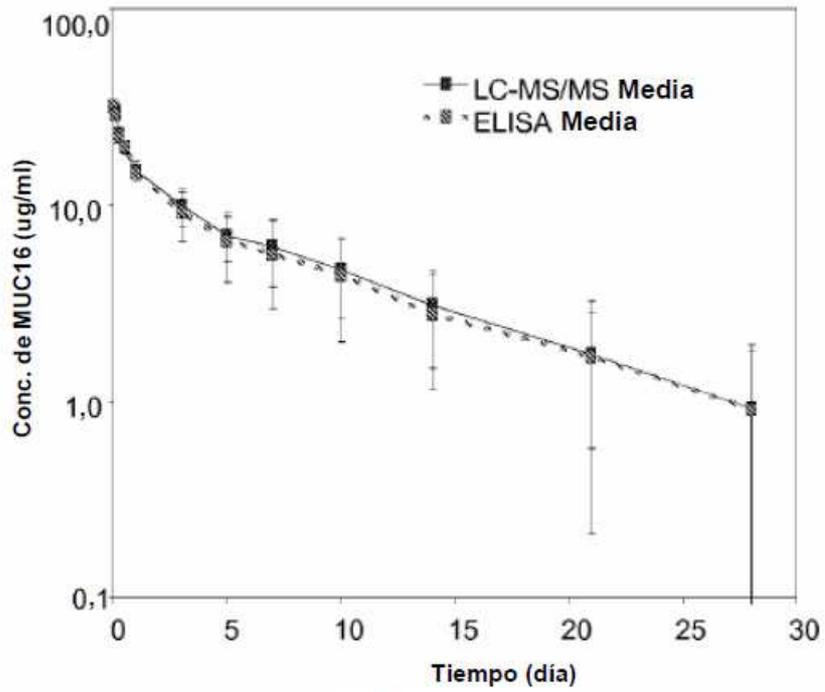


Figura 23

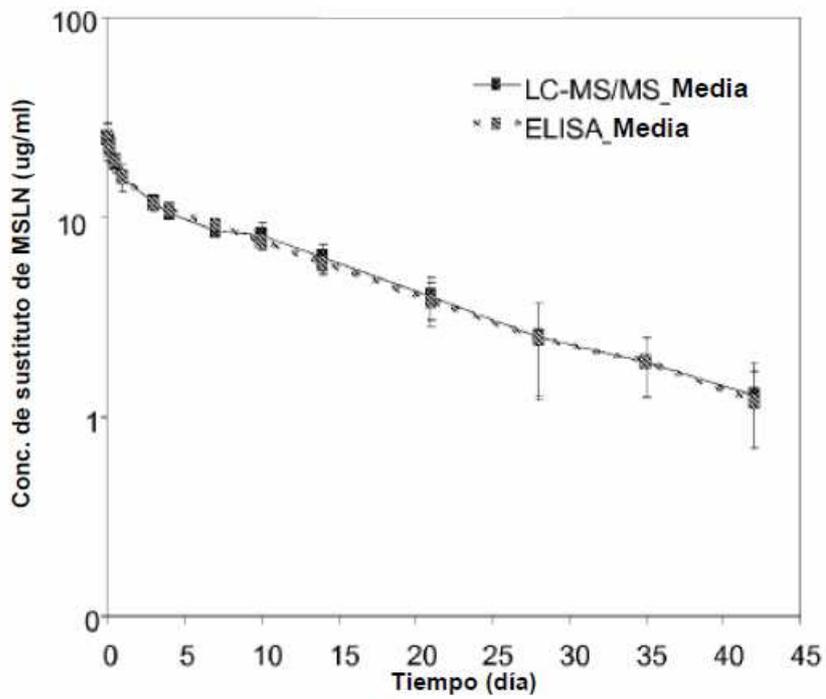


Figura 24

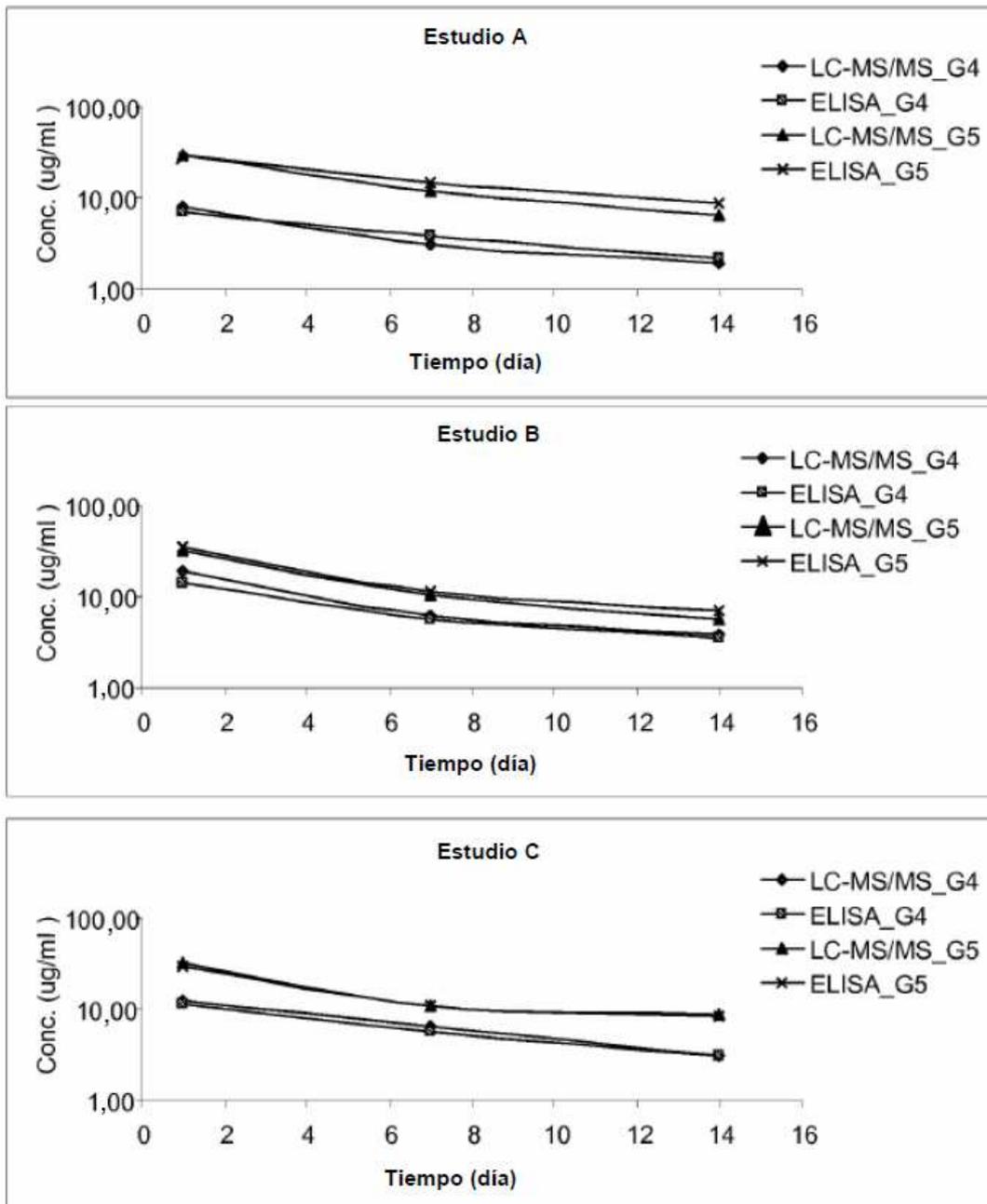


Figura 25