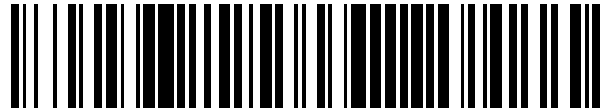


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 377**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016 PCT/EP2016/076739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17077080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016 E 16791588 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3371602**

54 Título: **Un método para cuantificar anticuerpos anti-TNF**

30 Prioridad:

**06.11.2015 WO PCT/EP2015/306759**

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

**05.05.2020**

73 Titular/es:

**PROMISE PROTEOMICS (100.0%)  
7 Parvis Louis Néel, Bht 52A, CS 20050  
38040 Grenoble cedex 9, FR**

72 Inventor/es:

**LEBERT, DOROTHÉE y  
PICARD, GUILLAUME**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 758 377 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

Un método para cuantificar anticuerpos anti-TNF

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de la cuantificación de anticuerpos. Más precisamente, se refiere a la cuantificación de anticuerpos anti-TNF en una muestra biológica.

10 **Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos monoclonales (Acm) constituyen una clase terapéutica que conoce el grado de desarrollo actual más intenso en el campo de la biotecnología farmacéutica. Hasta la fecha hay más de 50 Acm comercializados en diversos campos, tales como oncología, inmunología, oftalmología y cardiología.

15 Entre ellos, los anticuerpos anti-TNF que bloquean la acción de TNF-alfa han revolucionado la terapia de enfermedades relacionadas con TNF, tales como enfermedad intestinal inflamatoria, lupus, colitis ulcerosa, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y artritis reumatoide. Al neutralizar la actividad del TNF, los anticuerpos anti-TNF promueven la curación mucosa e inducen remisiones a largo plazo en pacientes. Los principales anticuerpos anti-TNF que están autorizados actualmente abarcan infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab.

20 Sin embargo, algunos pacientes no responden a la terapia con anticuerpos anti-TNF. En pacientes con una no respuesta primaria verdadera, los niveles de fármaco están en el intervalo terapéutico, pero la respuesta es escasa. Por el contrario, la no respuesta secundaria se produce cuando un paciente que respondió inicialmente a la terapia anti-TNF posteriormente pierde la respuesta, lo que puede indicar la presencia de anticuerpos antifármaco. Para ambas situaciones, la monitorización farmacológica terapéutica proporciona una herramienta esencial para evaluar opciones de tratamiento posteriores.

30 De manera ilustrativa, en cuanto a la terapia anti-TNF con infliximab, un estudio clínico había mostrado que, a pesar de que todos los pacientes habían recibido la misma dosis de este anticuerpo, la concentración de fármaco en suero oscilaba desde menos de 21,3 µg/ml en el cuartil inferior hasta más de 47,9 µg/ml en el cuartil superior a las ocho semanas (Reinish *et al.*, 2012, *Gastroenterology*, vol. 142 (supl. 1): S114). La proporción de pacientes que alcanzan remisión clínica, evaluada mediante la puntuación de Mayo, aumentaba con los cuartiles crecientes de concentración de infliximab en suero a las semanas 8. También se observó una correlación directa con la concentración de infliximab en suero para la respuesta clínica y la curación mucosa. Se observó una relación similar en un estudio abierto, multicéntrico, de fase 3, de pacientes pediátricos con colitis ulcerosa de moderada a grave (Adedokun *et al.*, 2013, *Inflamm Bowel Dis*, vol. 19 (nº13) :2753-2762).

40 Los resultados clínicos notificados anteriormente muestran que, en la terapia con anticuerpos anti-TNF, se requerirá monitorización farmacológica con el fin de individualizar la dosificación, monitorización que será lo más beneficiosa para los pacientes que muestren inicialmente una respuesta escasa o ausente. Además, pueden ser apropiados ajustes de dosis individualizados a medida que cambie la carga inflamatoria. Dado que la relación entre la dosis de fármaco y la exposición al fármaco varía de paciente a paciente, se revela que una monitorización más frecuente de los niveles de fármaco en suero y ajustes farmacológicos apropiados son necesarios para mantener concentraciones de fármaco eficaces.

50 Para monitorizar la concentración en suero de anticuerpos anti-TNF, se ha notificado el uso de un ensayo de cambio de movilidad basado en cromatografía de líquidos de alto rendimiento (Wang *et al.*, *J Immunol Methods*, 2012, vol. 382 (nº 1-2): 177-188). También se ha notificado el uso de diversos métodos ELISA (*World J Gastroenterol* 14 de febrero de 2015; 21(6): 1907-1914).

55 Como puede entenderse fácilmente, los métodos para monitorizar la concentración en suero de anticuerpos anti-TNF deberán ser altamente específicos, sensibles, precisos y reproducibles, para definir los ajustes de dosis apropiados que serán beneficiosos para un paciente. Dada la naturaleza polipeptídica de los Acm terapéuticos, su alto grado de homología con las IgG humanas endógenas y las bajas concentraciones a las que se esperan en el entorno plasmático, la determinación de concentraciones en plasma de anticuerpos monoclonales terapéuticos es difícil. Hasta la fecha, las técnicas de referencia para identificar y cuantificar los Acm se basan en métodos de ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) debido a su alta sensibilidad y disponibilidad. Sin embargo, los métodos ELISA presentan límites importantes especialmente en términos de fiabilidad. (Vande Casteele N, *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 765-771; Ungar B, *World Journal of Gastroenterology* 14 de febrero de 2015; 21(6):1907-1914).

65 La cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM) se consideró entonces un candidato ideal dada su alta especificidad, sensibilidad y precisión de medición. La CL-EM/EM permite más fiabilidad que las técnicas de inmunoensayo, al tiempo que mantiene una sensibilidad suficiente para la

cuantificación de anticuerpos en plasma humano. La CL-EM/EM, que ya se usa ampliamente para la cuantificación de moléculas pequeñas es una herramienta analítica en crecimiento para el análisis de proteínas terapéuticas y biomarcadores proteómicos. La especificidad y la sensibilidad de la detección por CL-EM/EM se consigue a través del análisis en modo de monitorización por reacción múltiple (MRM) de la proteína intacta o de un péptido sustituto de la proteína de interés obtenido tras la proteólisis enzimática de muestras (Duan, X., *et al.*, J Chromatogr A, 2012. 1251: págs. 63-73; Dubois, M., *et al.*, Anal Chem, 2008. 80(5): págs. 1737-45; Fernandez Ocana, M., *et al.*, Anal Chem, 2012. 84(14): págs. 5959-67; Heudi, O., *et al.*, Anal Chem, 2008. 80(11): págs. 4200-7; Lesur, A., E. Varesio, y G. Hopfgartner, J Chromatogr A, 2010. 1217(1): págs. 57-64; Liu, H., *et al.*, Anal Biochem, 2011. 414(1): págs. 147-53).

La cuantificación de un anticuerpo anti-TNF con un método de CL-EM/EM ya se ha realizado en la técnica. De manera ilustrativa, Kleinnijenhuis *et al.* (2015, J Appl Bioanal, vol. 1 (nº1): 26-34) han descrito un método para cuantificar infliximab mediante CL-EM/EM usando péptidos sustitutos SIL derivados de infliximab como patrones internos. El método descrito por Keinnijenhuis *et al.* (2015) se ha concebido para estudios preclínicos realizados en ratas usando péptidos sustitutos que no se encuentran en anticuerpos de rata. La cuantificación de infliximab mediante un método de CL-EM/EM también se ha descrito por Willrich *et al.* (2015, International Immunopharmacology, vol. 28: 513-520). El método descrito por Willrich *et al.* (2015) hizo uso de péptidos SIL derivados de infliximab así como IgG de caballo como patrón interno sustituto. Según este método, se normalizaron las áreas pico de péptido de infliximab con respecto a áreas pico de péptido de IgG de caballo y se usaron patrones internos de péptidos SIL para verificar el tiempo de retención de HPLC. Para el propósito de validar la especificidad de este método con respecto a la cuantificación exclusiva de infliximab, se garantizó la ausencia de cualquier interferencia con otros fármacos, incluyendo anticuerpos anti-TNF, tales como adalimumab.

Los presentes inventores han identificado ahora que existe una necesidad en la técnica de métodos de cuantificación de anticuerpos anti-TNF que permitan una cuantificación precisa de un anticuerpo anti-TNF terapéutico en muestras recogidas de pacientes sometidos a tratamientos con anticuerpos anti-TNF, métodos de cuantificación que serán útiles independientemente de la clase anticuerpo anti-TNF terapéutico que se haya administrado a esos pacientes y, además, insensibles a la potencial presencia de otros anticuerpos anti-TNF administrados previamente. De manera destacable, los presentes inventores han identificado que existe una necesidad de métodos simples todo en uno que permitan cuantificar anticuerpos anti-TNF en muestras de pacientes tratados de manera anti-TNF que no requieran que los expertos seleccionen un kit o método específico según el anticuerpo terapéutico anti-TNF que se espera que esté contenido en las muestras de los pacientes.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un método para cuantificar un anticuerpo anti-TNF en una muestra de un individuo humano que comprende las etapas de:

a) añadir a una muestra de prueba que puede contener anticuerpos anti-TNF terapéuticos una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos anti-TNF seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, mediante lo cual se proporciona una muestra de preproteólisis,

b) someter la muestra de preproteólisis a una proteólisis enzimática, para proporcionar una muestra de proteólisis que comprende (i) péptidos marcados por proteólisis derivados de los anticuerpos anti-TNF marcados y (ii) péptidos de proteólisis derivados del anticuerpo anti-TNF contenido en la muestra de prueba,

c) determinar mediante análisis de espectrometría de masas la razón entre (i) uno o más péptidos marcados por proteólisis seleccionados y (ii) uno o más péptidos de proteólisis correspondientes derivados de dicho anticuerpo anti-TNF,

d) calcular a partir de la razón determinada en la etapa c) la cantidad de dicho anticuerpo anti-TNF en la muestra de prueba.

En algunas realizaciones del método, la etapa b) comprende las siguientes etapas:

b1) una etapa de proteólisis enzimática en condiciones de desnaturalización, y

b2) una etapa de proteólisis enzimática en condiciones de no desnaturalización.

En algunas realizaciones del método, la proteólisis enzimática se realiza en la etapa b) usando tripsina.

Según algunos aspectos de estas realizaciones del método, el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan de un grupo que comprende:

- para infliximab, péptidos de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 1 a 8,

- para etanercept, péptidos de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 9 a 15,
- para adalimumab, péptidos de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 16 a 23,
- 5 - para certolizumab, péptidos de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 24 a 30, y
- para golimumab, péptidos de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 31 a 37.

10 En algunas otras realizaciones del método, la proteólisis enzimática se realiza en la etapa b) incubando la muestra de preproteólisis con una proteasa de selección como diana de bisagra, tal como una enzima degradadora de inmunoglobulina de *Streptococcus* (ideS).

Según algunos aspectos de estas otras realizaciones del método, el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan de un grupo que comprende:

- 15 - para infliximab, péptidos de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 38 y 39,
- para etanercept, un péptido de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 40,
- 20 - para adalimumab, los péptidos de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 41 y 42,
- para certolizumab, los péptidos de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 43 y 44, y
- para golimumab, los péptidos de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 45 y 46.

25 Según algunas realizaciones del método, la etapa a) comprende las siguientes etapas:

30 a1) añadir a una muestra de prueba que puede contener anticuerpos anti-TNF terapéuticos una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos anti-TNF seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, mediante lo cual se proporciona una muestra de preproteólisis no concentrada, y

35 a2) enriquecer la muestra de preproteólisis no concentrada en anticuerpos, mediante lo cual se proporciona una muestra de preproteólisis.

En realizaciones preferidas del método, la muestra de prueba es una muestra humana de un individuo al que se le ha administrado un anticuerpo anti-TNF seleccionado de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab.

40 La presente invención se refiere también a kits que son útiles para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF que se describe en el presente documento.

### **Descripción de las figuras**

45 **Figura 1:** Curva de titulación inversa obtenida para infliximab, medida en presencia de otros dos anticuerpos anti-TNF en una muestra de prueba.

50 Ordenadas: Concentración medida de infliximab expresada en µg/ml. Abscisas: concentración esperada de infliximab expresada en µg/ml.

**Figura 2:** Evaluación de la concentración máxima de anticuerpos anti-TNF que pueden estar presentes en una muestra de prueba sin afectar a la captura de antígeno cuando se usa el método MSIA.

55 Ordenadas: Concentración medida de infliximab expresada en µg/ml. Abscisas: concentración esperada de infliximab expresada en µg/ml.

### **Descripción detallada de la invención**

60 Esta invención proporciona un método para cuantificar un anticuerpo anti-TNF en muestras de individuos humanos que se tratan con anticuerpos anti-TNF terapéuticos, método que permite una cuantificación precisa de anticuerpos anti-TNF, independientemente de la identidad del anticuerpo anti-TNF terapéutico que esté contenido en dicha muestra que debe someterse a prueba.

65 La disponibilidad del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF que se describe en el presente documento proporciona ahora a los profesionales un método sencillo que puede usarse en general con muestras de cualquier

individuo humano que recibe un tratamiento terapéutico con anticuerpos anti-TNF, sin tener en cuenta la clase de anticuerpo anti-TNF que se ha administrado a dicho individuo humano.

5 De manera destacable, en unidades de cuidado médico en las que algunos pacientes reciben un tratamiento con un primer anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, infliximab) y en las que algunos otros pacientes reciben un tratamiento con un segundo anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, etanercept), el uso del método de cuantificación anti-TNF descrito en el presente documento ya no requiere una selección de un método de cuantificación específico para un anticuerpo tal como es el caso según la presente práctica habitual.

10 Además, en situaciones en las que el tratamiento de un paciente se documenta de manera errónea, por ejemplo, en situaciones en las que se cree que dicho paciente ha recibido un primer anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, infliximab), pero en realidad ha recibido un segundo anticuerpo (por ejemplo, golimumab), el método de cuantificación anti-TNF descrito en el presente documento permite no obstante (i) determinar qué anticuerpo anti-TNF ha recibido realmente dicho paciente y (ii) cuantificar el anticuerpo anti-TNF que se ha administrado a dicho paciente, a pesar de la información errónea proporcionada al laboratorio de prueba en relación con el anticuerpo anti-TNF terapéutico usado realmente.

15 Todavía además, en situaciones en las que el paciente se somete a una terapia de combinación al administrársele más de un anticuerpo anti-TNF, la determinación de la cantidad en circulación global de anticuerpos anti-TNF, independientemente de la identidad y del número de anticuerpos anti-TNF que se usan, puede realizarse globalmente usando el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF que se describe en el presente documento.

20 Aún además, en situaciones en las que el paciente recibió un primer tratamiento basado en un primer anticuerpo anti-TNF terapéutico y entonces un segundo tratamiento basado en un segundo anticuerpo terapéutico, se obtiene como resultado que, durante un periodo de tiempo posterior a dicho cambio de tratamiento, ambos anticuerpos terapéuticos anti-TNF estarán presentes en los fluidos corporales del paciente, principalmente en el plasma del paciente. En estas situaciones, el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento permite la cuantificación de todos los anticuerpos anti-TNF en dicho paciente y permite también cuantificar las respectivas cantidades (por ejemplo, concentración en plasma) de cada uno de los anticuerpos anti-TNF terapéuticos.

25 La presente invención proporciona un método para cuantificar uno o más anticuerpos anti-TNF en muestras humanas, permitiendo dicho método la cuantificación de dichos anticuerpos anti-TNF, incluso cuando la identidad de los anticuerpos anti-TNF que se administraron a los pacientes sometidos a prueba no se conoce de manera precisa. Esta invención se refiere a un método para cuantificar un anticuerpo anti-TNF en una muestra de un individuo humano que ha recibido un tratamiento terapéutico con un anticuerpo anti-TNF que puede seleccionarse de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab.

30 Para realizar el método de cuantificación descrito en el presente documento, las dos o más formas marcadas de anticuerpos terapéuticos, es decir los dos anticuerpos terapéuticos marcados, son formas marcadas de anticuerpos terapéuticos que son susceptibles de estar presentes en la muestra humana que debe someterse a prueba.

35 De manera ilustrativa, para cuantificar anticuerpos terapéuticos susceptibles de estar contenidos en muestras humanas que proceden de pacientes alojados en unidades de cuidado médico tratados con anticuerpos anti-TNF y en las que una pluralidad de anticuerpos anti-TNF terapéuticos se usan actualmente para diversos tratamientos, entonces dos o más de las formas marcadas de dichos anticuerpos anti-TNF terapéuticos se añaden en la etapa a) del método de cuantificación. De manera ilustrativa, para cuantificar anticuerpos anti-TNF terapéuticos en muestras humanas que proceden de unidades de cuidado médico que hacen uso de o bien infliximab, etanercept y adalimumab, entonces las formas marcadas de infliximab, etanercept y adalimumab se añaden en la etapa a) del método de cuantificación. De hecho, un número mayor de anticuerpos terapéuticos marcados, por ejemplo, un número mayor de anticuerpos anti-TNF terapéuticos marcados, pueden añadirse en la etapa a) del método, por ejemplo, los cinco anticuerpos anti-TNF terapéuticos infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab. Tales realizaciones del método de cuantificación permiten realizar la misma realización del método de cuantificación descrito en el presente documento, por ejemplo, con adición de cinco anticuerpos anti-TNF terapéuticos, para cuantificar anticuerpos anti-TNF en muestras humanas proporcionadas por una pluralidad de unidades de cuidado médico que hacen uso de distintos anticuerpos anti-TNF, tales como (i) una primera unidad de cuidado médico que realiza tratamientos con infliximab o adalimumab, (ii) una segunda unidad de cuidado médico que realiza tratamientos con etanercept, adalimumab o golimumab y (iii) una tercera unidad de cuidado médico que realiza tratamientos con infliximab, certolizumab y golimumab. Tal como se ilustra, el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en el presente documento puede realizarse dentro de las premisas de una unidad de plataforma de pruebas que centraliza las pruebas de muestras humanas que proceden de una pluralidad de unidades de cuidado médico.

40 Por tanto, según el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en el presente documento, una muestra de prueba "que puede contener anticuerpos terapéuticos" significa una muestra humana de la que se espera que comprenda al menos un anticuerpo terapéutico que debe cuantificarse mediante una realización del

método de cuantificación, en el que dos o más anticuerpos terapéuticos marcados se añaden en la etapa a) y en el que al menos una forma marcada de dicho al menos un anticuerpo terapéutico, incluido en dichos dos o más anticuerpos terapéuticos marcados, se añaden en la etapa a).

5 Por tanto, según el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en el presente documento, una muestra de prueba “que puede contener anticuerpos terapéuticos” significa una muestra humana de la que se espera que comprenda al menos un anticuerpo terapéutico que debe cuantificarse mediante una realización del método de cuantificación, en el que dos o más anticuerpos terapéuticos marcados se añaden en la etapa a) y en el que al menos una forma marcada de dicho al menos un anticuerpo terapéutico, incluido en dichos dos o más anticuerpos terapéuticos marcados, se añaden en la etapa a). Por tanto, la etapa a) comprende añadir una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de anticuerpos terapéuticos a una muestra de prueba de la que se sospecha que contiene uno o más anticuerpos terapéuticos y en la que una o más de dichas formas marcadas de anticuerpos terapéuticos incluyen una forma marcada del uno o más anticuerpos terapéuticos de los que se espera que estén contenidos en dicha muestra de prueba.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, “un” o “al menos un” engloba “uno” o “más de uno”, lo cual engloba una “pluralidad de anticuerpos terapéuticos” tal como dos o más de dos, lo cual engloba tres, cuatro, cinco o incluso más de cinco anticuerpos terapéuticos.

20 Por consiguiente, los métodos de cuantificación de los anticuerpos terapéuticos que se describen en el presente documento son adecuados para cuantificar un anticuerpo terapéutico en una muestra de un individuo humano, lo cual engloba la cuantificación de al menos un anticuerpo terapéutico en una muestra de un individuo humano; lo cual engloba la cuantificación de dos o más (una pluralidad) de anticuerpos terapéuticos en una muestra de un individuo humano.

25 Por lo tanto, la invención se refiere a un método para cuantificar dos o más anticuerpos terapéuticos en una muestra de un individuo humano, tal como se ha definido anteriormente, donde la muestra de prueba puede contener dos o más de dichos anticuerpos terapéuticos que se han de cuantificar.

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “comprende” o “que comprende” abarca también “consiste en” o “que consiste en”.

35 Tal como se usa en el presente documento, un “anticuerpo terapéutico” se refiere a un anticuerpo que es adecuado para su uso como medicamento, y que puede consistir o bien en un anticuerpo completo o bien un fragmento del mismo; que incluye cualquier fragmento seleccionado de un grupo que comprende: anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos y anticuerpos quimérico. La mayoría de los anticuerpos terapéuticos son anticuerpos monoclonales, en particular del tipo IgG. Los fragmentos de los mismos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fc, pFc, cadena pesada y cadena ligera.

40 El método de cuantificación que se describe en el presente documento permite la cuantificación de dos o más anticuerpos anti-TNF, independientemente de la identidad de dichos anticuerpos anti-TNF. Los anticuerpos anti-TNF que deben cuantificarse mediante el método descrito en el presente documento pueden ser cualquier anticuerpo anti-TNF de interés terapéutico, por ejemplo, cualquier anticuerpo anti-TNF que sea el sujeto de una autorización de comercialización, en el momento de la realización de dicho método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF.

45 En algunas realizaciones, el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en el presente documento puede realizarse para dos o más anticuerpos seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab.

50 Infliximab etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab son polipéptidos, cuyas respectivas secuencias de se describen a continuación en el presente documento.

- Para infliximab:

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVCVASFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSK  
SINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVIYCSRNYYGSTYDY  
WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP  
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA  
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK (cadena pesada, SEQ ID NO. 47)

DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQFVGGSSIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESMSGI  
PSRFSGSGSGTDFTLTINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
STYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (cadena ligera, SEQ  
ID NO. 48)

5

- Para adalimumab:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWN  
SGHIDYADSVGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLD  
YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE  
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPGK (cadena pesada, SEQ ID NO. 49)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQS  
GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (cadena ligera,  
SEQ ID NO. 50)

10

- Para etanercept:

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNVWPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTRPGWYCALSQKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSENNTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMPGPSPPAEGSTGDEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 51)

- Para certolizumab:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYIGEPYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYRSYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCAA (cadena pesada, SEQ ID NO. 52)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPKGKAPKALIYSASFLYSGVPYRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (cadena ligera, SEQ ID NO. 53)

- Para golimumab:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMDVISSQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (cadena pesada, SEQ ID NO. 54)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASOSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (cadena ligera, SEQ ID NO. 55)

15 De manera más precisa, esta invención se refiere a un método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de este tipo, método que hace uso de una técnica de cuantificación de CL-EM/EM.



Generalmente, para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, dos o más anticuerpos anti-TNF de referencia (también denominados “compuestos patrón internos” en el presente documento) se añaden a una muestra de prueba, antes de someter la muestra resultante (también denominada “muestra de preproteólisis” a proteólisis enzimática, para proporcionar una “muestra de proteólisis” que comprende

5 (i) péptidos de proteólisis derivados de los anticuerpos anti-TNF de referencia y (ii) péptidos de proteólisis derivados del anticuerpo anti-TNF contenido en la muestra de prueba. En una etapa adicional del método, la cantidad de los anticuerpos anti-TNF que estaban contenidos inicialmente en la muestra de prueba se determina mediante un método de espectrometría de masas, que incluye el cálculo de una razón entre (i) uno o más péptidos de proteólisis seleccionados derivados de los anticuerpos anti-TNF de referencia y (ii) uno o más péptidos de proteólisis correspondientes derivados de dichos anticuerpos anti-TNF susceptibles de estar contenidos inicialmente en la muestra de prueba.

De hecho, para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, es esencial que puedan distinguirse (i) un péptido de proteólisis dado derivado de un anticuerpo anti-TNF de referencia (compuesto patrón interno) y (ii) el péptido de proteólisis correspondiente derivado del anticuerpo anti-TNF contenido inicialmente en la muestra de prueba mediante las respectivas señales de espectrometría que se generan mediante estos péptidos, para posibilitar el cálculo de una razón entre (i) dicho péptido de proteólisis derivado de dicho anticuerpo anti-TNF de referencia y (ii) dicho péptido de proteólisis correspondiente derivado del anticuerpo anti-TNF contenido inicialmente en la muestra de prueba.

En realizaciones preferidas del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, estos péptidos de proteólisis pueden distinguirse mediante espectrometría de masas usando un compuesto patrón interno que consiste en un anticuerpo anti-TNF marcado, y lo más preferiblemente un anticuerpo anti-TNF marcado isotópicamente estable (SIL, *Stable Isotopically Labeled*).

De hecho, el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento está diseñado específicamente para cuantificar la cantidad (por ejemplo, la concentración) de anticuerpos anti-TNF contenidos en fluidos corporales de un paciente tratado con tales anticuerpos anti-TNF, es decir anticuerpos anti-TNF terapéuticos no marcados, de modo que los anticuerpos anti-TNF de referencia son lo más preferiblemente anticuerpos anti-TNF marcados, y lo más preferiblemente anticuerpos anti-TNF marcados isotópicamente estables (SIL), tal como se ilustra de manera completa a lo largo de toda la presente memoria descriptiva.

La presente invención se refiere a un método para cuantificar un anticuerpo anti-TNF en una muestra de un individuo humano que comprende las etapas de:

a) añadir a una muestra de prueba que puede contener anticuerpos anti-TNF terapéuticos una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos anti-TNF seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, mediante lo cual se proporciona una muestra de preproteólisis,

b) someter la muestra de preproteólisis a una proteólisis enzimática, para proporcionar una muestra de proteólisis que comprende (i) péptidos marcados por proteólisis derivados de los anticuerpos anti-TNF marcados y (ii) péptidos de proteólisis derivados del anticuerpo anti-TNF contenido en la muestra de prueba,

c) determinar mediante análisis de espectrometría de masas la razón entre (i) uno o más péptidos marcados por proteólisis seleccionados y (ii) uno o más péptidos de proteólisis correspondientes derivados de dicho anticuerpo anti-TNF,

d) calcular a partir de la razón determinada en la etapa c) la cantidad de dicho anticuerpo anti-TNF en la muestra de prueba.

Los inventores han mostrado que una cuantificación precisa de anticuerpos anti-TNF en una muestra humana, que también puede denominarse “muestra de prueba” en el presente documento, puede permitirse a través del diseño de un método, en el que la cantidad de anticuerpos anti-TNF, si están presentes en dicha muestra, se determina mediante un análisis de espectrometría de masas que hace uso de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos anti-TNF como patrones internos de un método de cuantificación de CL-EM/EM.

Los inventores han mostrado en el presente documento que el método que han concebido permite una cuantificación sensible, específica y reproducible de anticuerpos terapéuticos en muestras humanas, que abarca muestras de plasma humano y muestras de suero humano. Estas ventajas del método de cuantificación descrito en el presente documento son altamente destacables, dado que la mayoría de los anticuerpos anti-TNF terapéuticos que deben cuantificarse consisten en anticuerpos humanizados o anticuerpos “humanos completos” que comparten la mayoría de sus secuencias de aminoácidos con los anticuerpos que se encuentran de manera natural en los fluidos corporales humanos, incluyendo los anticuerpos que se encuentran en el suero humano o el plasma humano. Esta situación representó un gran reto técnico para seleccionar péptidos derivados de anticuerpos únicos y específicos relevantes que deben monitorizarse mediante espectrometría, que de lo contrario no se encuentran de manera natural en fluidos corporales humanos, incluyendo suero humano o plasma humano.

De manera ilustrativa, infliximab es un anticuerpo anti-TNF quimérico murino-humano y por tanto contiene en su mayoría secuencias de aminoácidos humanas que se encuentran en anticuerpos humanos. Infliximab es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado mediante ingeniería genética dirigido contra el antígeno TNF-alfa. El anticuerpo es una inmunoglobulina IgG1 kappa que contiene secuencias de región variable de cadena ligera y pesada murinas y secuencias de región constante humanas. Significa que las secuencias de aminoácidos encontradas en las regiones constantes son comunes a las secuencias de aminoácidos de IgG humanas de las regiones variables.

Etanercept es una proteína de fusión dimérica recombinante que consiste en la parte de unión a ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kiloDalton (p75) humano ligado a la parte Fc de IgG1 humana. El componente Fc de etanercept contiene el dominio CH2, el dominio CH3 y la región bisagra, pero no el dominio CH1 de IgG1. Las únicas secuencias de aminoácidos que difieren de las secuencias de proteína humanas se encuentran en la región de unión.

Adalimumab es un anticuerpo monoclonal humano frente a TNF-alfa, producido mediante tecnología de ADN recombinante usando un sistema de expresión de células de mamífero. Se encuentran diferencias de aminoácido minúsculas en la región variable en comparación con las secuencias de IgG humana. Certolizumab pegol es un fragmento de anticuerpo Fab' recombinante frente al factor de necrosis tumoral alfa que está conjugado con un polietilenglicol de aproximadamente 40 kDa. Se encuentran diferencias de aminoácido minúsculas en la región variable del Fab' en comparación con las secuencias de IgG humana.

Golimumab es un anticuerpo monoclonal de IgG1k humana derivado de la inmunización de ratones modificados mediante ingeniería genética con TNF $\alpha$  humano. Se encuentran diferencias de aminoácido minúsculas en la región variable en comparación con las secuencias de IgG humana.

Como se entiende fácilmente a partir de la presente memoria descriptiva, el método de cuantificación descrito en el presente documento es útil tanto (i) en situaciones en las que un paciente sometido a prueba ha recibido un tratamiento terapéutico mediante la administración de un anticuerpo anti-TNF terapéutico único como (ii) en situaciones en las que un paciente sometido a prueba ha recibido, simultánea o secuencialmente, más de un anticuerpo terapéutico anti-TNF.

Tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento, los inventores han mostrado que puede realizarse una cuantificación precisa de anticuerpos anti-TNF en una muestra humana a través del diseño de un método, en el que la cantidad de anticuerpos anti-TNF, si están presentes en dicha muestra, se determina mediante un método de espectrometría de masas que hacen uso de (i) péptido(s) de proteólisis derivado(s) de dos o más anticuerpos anti-TNF terapéuticos contenidos en dicha muestra humana y (ii) péptido(s) de proteólisis derivado(s) de una forma marcada de dichos dos o más anticuerpos anti-TNF tras:

(A) calcular una razón entre:

(i) la señal de espectrometría generada por uno o más péptidos de proteólisis derivados de anticuerpos anti-TNF seleccionados de cada uno de dos o más anticuerpos anti-TNF

y

(ii) la señal de espectrometría generada por uno o más péptidos de proteólisis derivados de anticuerpos anti-TNF marcados seleccionados de cada una de las dos o más formas marcadas de dichos dos o más anticuerpos anti-TNF usados como compuesto(s) patrón interno(s), y

(B) determinar la cantidad de anticuerpos anti-TNF, si están presentes, en dicha muestra humana notificando el valor de razón calculado en la etapa (A) para cada uno del uno o más péptidos de proteólisis a una curva de calibración de valores de razón.

La clase del/de los compuesto(s) patrón interno(s) que se usa(n), concretamente anticuerpos anti-TNF marcados completos, contribuye enormemente a la exactitud y precisión del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF que se describe en el presente documento tal como se explica en otra parte en la presente memoria descriptiva.

#### Compuestos patrón internos para cuantificar anticuerpos anti-TNF

Tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento, (1) la alta especificidad de los péptidos de proteólisis derivados de estos compuestos patrón internos y de los anticuerpos anti-TNF terapéuticos frente a proteínas de plasma humano endógenas, así como (2) la alta homología fisicoquímica de (i) los péptidos de proteólisis derivados de estos compuestos patrón internos, y de (ii) la proteólisis derivada de los anticuerpos anti-TNF terapéuticos, permite una cuantificación altamente precisa de dichos anticuerpos anti-TNF en una muestra.

Para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, dos o más anticuerpos anti-TNF marcados distintos se añaden a la muestra de prueba. Se generan péptidos de proteólisis marcados específicos (también denominados “péptidos sustitutos marcados”) en la etapa b), junto con los péptidos de proteólisis no marcados correspondientes (también denominados “péptidos sustitutos” o “péptidos sustitutos no marcados”) de los anticuerpos anti-TNF no marcados correspondientes que deben cuantificarse que estaban inicialmente presentes en dicha muestra de prueba.

Entonces, tal como se describe más detalladamente en la presente memoria descriptiva, el uno o más anticuerpos anti-TNF presentes en la muestra de prueba se cuantifican mediante un método de espectrometría de masas, en el que las señales generadas por los pares marcados y no marcados de péptidos sustitutos se miden para determinar una razón entre las dos señales generadas (es decir la señal generada por un péptido sustituto marcado específico y la señal generada por la pareja de péptido sustituto no marcado específico). Entonces, los valores de razón se usan para determinar la concentración del/de los anticuerpo(s) anti-TNF contenido(s) inicialmente en la muestra de prueba. Lo más preferiblemente, dichos valores de razón se usan para determinar la concentración del/de los anticuerpo(s) anti-TNF contenidos inicialmente en la muestra de prueba notificando estos valores de razón a una curva de calibración de valores de razón. Por consiguiente, dichos “valores” consisten en las señales de espectrometría generadas mediante los péptidos de proteólisis monitorizados.

Entonces, el/los valor(es) de razón se notifican a una curva de calibración para determinar la cantidad (por ejemplo, la concentración) de uno o más anticuerpos anti-TNF en la muestra de prueba.

En algunas realizaciones, una curva de calibración representa (i) la cantidad medida de un anticuerpo anti-TNF de interés (por ejemplo, en las ordenadas) frente a (ii) la cantidad esperada de dicho anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, en las abscisas).

En algunas otras realizaciones, una curva de calibración representa (i) los valores de razón entre el área de señal de espectrometría de un anticuerpo anti-TNF de interés y el área de señal de espectrometría del anticuerpo anti-TNF marcado correspondiente (compuesto patrón interno) (por ejemplo, en las ordenadas) frente a (ii) la cantidad esperada de dicho anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, en las abscisas).

Cuanto mayor sea el número de anticuerpos anti-TNF marcados distintos añadidos en la muestra de prueba en la etapa a) del método, mayor será el número de anticuerpos anti-TNF distintos que puede cuantificarse en una muestra de prueba usando el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, este uno o más anticuerpos anti-TNF marcados corresponden a (i) la(s) forma(s) marcada(s) de uno o más anticuerpos anti-TNF que se han administrado a dicho individuo, y/o de (ii) la(s) forma(s) marcada(s) de uno o más anticuerpos terapéuticos que pueden estar presentes dentro de dicha muestra de prueba.

En algunas realizaciones, estos anticuerpos anti-TNF marcados pueden consistir en uno o más anticuerpos anti-TNF que comprenden uno o más péptidos firma presentes dentro de los anticuerpos anti-TNF que (i) se han administrado a dicho individuo, y/o que (ii) pueden estar presentes dentro de dicha muestra de prueba, y que deben cuantificarse.

En algunas realizaciones, estos anticuerpos anti-TNF y anticuerpos anti-TNF marcados pueden consistir en uno o más anticuerpos de IgG humanizados, y fragmentos de los mismos.

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, el número de anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos oscila entre dos y cinco anticuerpos marcados distintos, abarcando dos, tres, cuatro y cinco anticuerpos marcados distintos. Estos anticuerpos marcados pueden seleccionarse de un grupo que comprende infliximab marcado, etanercept marcado, adalimumab marcado, certolizumab marcado y golimumab marcado.

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos comprenden infliximab marcado y etanercept marcado.

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos comprenden infliximab marcado y adalimumab marcado.

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos comprenden infliximab marcado y certolizumab marcado.



En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos comprenden certolizumab marcado, infliximab marcado y golimumab marcado.

5 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos comprenden infliximab marcado, etanercept marcado, adalimumab marcado y certolizumab marcado.

10 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos comprenden infliximab marcado, etanercept marcado, adalimumab marcado y golimumab marcado.

15 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos comprenden infliximab marcado, adalimumab marcado, certolizumab marcado y golimumab marcado.

20 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos comprenden infliximab marcado, etanercept marcado, certolizumab marcado y golimumab marcado.

25 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos comprenden etanercept marcado, adalimumab marcado, certolizumab marcado y golimumab marcado.

30 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos patrón internos comprenden infliximab marcado, etanercept marcado, adalimumab marcado, certolizumab marcado y golimumab marcado.

35 Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo anti-TNF "marcado", también denominado en el presente documento "forma marcada de un anticuerpo anti-TNF", seleccionado de un grupo que comprende infliximab marcado, etanercept marcado, adalimumab marcado, certolizumab marcado y golimumab marcado consiste en un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo anti-TNF terapéutico seleccionado de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab y que se ha obtenido mediante un método según el cual uno o más aminoácidos marcados se han incorporado en la(s) cadena(s) de polipéptido. Métodos para marcar los anticuerpos anti-TNF que se usan como compuestos patrón internos en el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento se dan a conocer en otra parte en la presente memoria descriptiva.

40 Para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, en el que la etapa de proteólisis b) hace uso de tripsina como la única proteasa o de tripsina como proteasa contenida en una mezcla de proteasas, el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan de un grupo que comprende:

- para infliximab:

45 LEESGGGLVQPGGSMK (SEQ ID NO. 1),  
GLEWVAEIR (SEQ ID NO. 2),  
SINSATHYAESVK (SEQ ID NO. 3),  
SAVYLQMTDLR (SEQ ID NO. 4),  
TEDTGVYYCSR (SEQ ID NO. 5),  
50 DILLTQSPAILSVSPGER (SEQ ID NO. 6),  
ASQFVGSSIHWYQQR (SEQ ID NO. 7),  
YASESMGIPSR (SEQ ID NO.8),

- para etanercept:

55 LPAQVAFTPYAPEPGSTCR (SEQ ID NO. 9),  
EYYDQTAQMCCSK (SEQ ID NO. 10),  
CSSDQVETQACTR (SEQ ID NO. 11),  
ICTCRPGWYCALS (SEQ ID NO. 12),  
60 LCAPLR (SEQ ID NO. 13),  
SMAPGAVHLPQPVSTR (SEQ ID NO. 14),  
SQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGSTGDEPK (SEQ ID NO. 15),

- para adalimumab:

65 GLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGR (SEQ ID NO. 16),

VSYLSTASSLDYWGGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO.17),  
 QAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVGR (SEQ ID NO.18),  
 ASQGIR (SEQ ID NO. 19),  
 NYLAWYQQKPGK (SEQ ID NO. 20),  
 5 LLIYAASLTQSGVPSR v(SEQ ID NO. 21),  
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQR (SEQ ID NO.22),  
 APYTFGQGTK (SEQ ID NO. 23),

- para certolizumab:

10 LSCAASGYVFTDYGMNWVR (SEQ ID NO. 24),  
 GLEWMGWINTYIGEPYADSVK (SEQ ID NO.25),  
 FTFSLDTSK (SEQ ID NO. 26),  
 STAYLQMNSLR (SEQ ID NO. 27),  
 15 ASQNVGTNVAWYQQKPGK (SEQ ID NO. 28),  
 ALIYSASFLYSGVPYR (SEQ ID NO. 29)  
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTK (SEQ ID NO. 30),

- para golimumab:

20 LSCAASGFIFSSYAMHWVR (SEQ ID NO. 31),  
 QAPNGLEWVAFMSYDGSNK (SEQ ID NO. 32),  
 GIAAGGNYYYYGMDVISSQGTTVTVSSASTK (SEQ ID NO. 33),  
 ASQSVYSILAWYQQK (SEQ ID NO. 34),  
 25 LLIYDASNR (SEQ ID NO. 35),  
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQR (SEQ ID NO. 36),  
 SNWPPFTFGPGTK (SEQ NO. 37).

30 Para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, en el que la etapa de proteólisis b) hace uso de una proteasa de selección como diana de bisagra, el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan de un grupo que comprende:

- para infliximab:

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVCVASFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRS  
 KSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVYYCSRNYYGST  
 YDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  
 35 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG [*VH + CHI*] (SEQ ID NO. 38),

y

DILLTQSPAILSVPGERVFSFCRASQFVGGSSIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESMS  
 GIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVKRTVA  
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
 QDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
 40 [*VL + CL*] (SEQ IDNO. 39),

- para etanercept:

45 LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTV  
 DSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSQVETQACTREQNRICRCPGWYCAL  
 SKQEGCRLCAPLRKCRPGFVARPGTETSDVVKPCAPGTFSTNTSSTDICRPH  
 QICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAP  
 STSFLPMGPPPAEGSTGDEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG [*Fracción P75 del*  
*receptor soluble de TNF-alfa*] (SEQ ID NO. 40),

50 - para adalimumab:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIT  
 WNSGHIDYADSVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTA  
 SSLDYWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT  
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG **[VH + CHI]** (SEQ ID NO. 41),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLT  
 QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRT  
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
 VTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
**[VL + CL]** (SEQ ID NO.42)

5 - *para certolizumab:*

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGKGLEWMGWI  
 NTYIGIPIYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYRSYA  
 MDYWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
 VDCKVEPKSCDKTHTCAA **[VH + CHI]** (SEQ ID NO. 43),

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALISASFL  
 YSGVPYRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTKVEIKRT  
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
 VTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
**[VL + CL]** (SEQ ID NO. 44),

- *para golimumab:*

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLWVAFMS  
 YDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAA  
 GGNYYYYGMDVISSQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD  
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN  
 HKPSNTKVDCKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG **[VH + CHI]** (SEQ ID NO. 45),

15 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR  
 ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCOORSNWPPFTFGPGTKVDIKRT  
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
 VTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
**[VL + CL]** (SEQ ID NO. 46)

20 Los anticuerpos anti-TNF que se usan como compuestos patrón internos se marcan con uno o más isótopos  
 estables. Los isótopos estables pueden seleccionarse de un grupo que comprende <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N y <sup>18</sup>O.  
 Preferiblemente, los isótopos estables se seleccionan de un grupo que comprende <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N.

En algunas realizaciones, el marcaje isotópico está restringido solo a aminoácidos específicos, que son  
 preferiblemente arginina, lisina y/o leucina.

25

Por tanto, un péptido marcado con isótopo estable (SIL) generado mediante la proteólisis de un anticuerpo anti-TNF marcado (anticuerpo anti-TNF SIL) usado como compuesto patrón interno, debido a un incremento de masa suficiente en relación con el mismo péptido pero sin marcar (es decir un péptido sin marcar generado mediante la proteólisis del anticuerpo anti-TNF no marcado correspondiente presente inicialmente en la muestra de prueba), se discrimina de dicho péptido de proteólisis no marcado mediante análisis de espectrometría de masas.

Por tanto, un péptido marcado con isótopo estable seleccionado de un grupo que comprende los péptidos sustitutos de SEQ ID NO 1-8 (para infliximab), 9-15 (para etanercept), 16-23 (para adalimumab), 24-30 (para certolizumab) o 31-35 (para golimumab) se discrimina mediante análisis de espectrometría de masas, de los péptidos sustitutos no marcados de las mismas respectivas secuencias de aminoácidos que se generan tras el tratamiento con tripsina de infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab o golimumab, respectivamente.

También, un péptido marcado con isótopo estable seleccionado de un grupo que comprende los péptidos sustitutos de SEQ ID NO 38-39 (para infliximab), 40 (para etanercept), 41-42 (para adalimumab), 43-44 (para certolizumab) o 45-46 (para golimumab) se discrimina mediante análisis de espectrometría de masas, de los péptidos sustitutos no marcados de las mismas respectivas secuencias de aminoácidos que se generan tras el tratamiento con IdeS de infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab o golimumab, respectivamente.

Los anticuerpos anti-TNF marcados con isótopo estables (SIL) están, de manera destacable, disponibles comercialmente.

De manera ilustrativa, los péptidos SIL pueden obtenerse de JPT Peptide Technologies GmbH (Berlín, Alemania) o de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, Francia) con el nombre péptidos Aqua™.

En particular, anticuerpos terapéuticos marcados con isótopo estables (SIL) están disponibles de la empresa francesa Promise Advanced Proteomics (Grenoble, Francia).

#### Generación de una curva de calibración

La cuantificación precisa de anticuerpos anti-TNF mediante análisis de espectrometría de masas se permite mediante el uso de al menos un compuesto patrón interno para cada anticuerpo anti-TNF de interés, cuya presencia en combinación con dicho anticuerpo de interés en una muestra humana permite el cálculo de valores de razón entre (i) la señal de espectrometría generada por un péptido sustituto de proteólisis seleccionado derivado de un anticuerpo anti-TNF terapéutico específico y (ii) la señal de espectrometría generada por un péptido sustituto marcado seleccionado correspondiente generado mediante el tratamiento de proteólisis enzimática de una forma marcada uno de dichos anticuerpos anti-TNF.

Tal como se detallará adicionalmente en la presente memoria descriptiva, la cuantificación de anticuerpos anti-TNF se realiza notificando el valor de razón calculado para cada péptido de proteólisis considerado en la muestra humana sometida a prueba, o muestra de prueba, a una curva de calibración de valores de razón generada, para cada anticuerpo anti-TNF terapéutico de interés, con cantidades conocidas de dicho anticuerpo anti-TNF terapéutico de interés y cantidades fijadas y conocidas de una forma marcada uno de dichos anticuerpos anti-TNF que se usa como compuesto patrón interno.

Para generar una curva de calibración, se preparan una serie o un conjunto de muestras de calibración (CS), en las que:

- cada muestra de calibración contiene una cantidad conocida del anticuerpo anti-TNF seleccionado, lo más preferiblemente una cantidad conocida de un anticuerpo anti-TNF seleccionado de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab,

- cada muestra de calibración contiene una cantidad fija y conocida de una forma marcada uno de dichos anticuerpos anti-TNF usado como compuesto patrón interno, lo más preferiblemente una cantidad fija y conocida de una forma marcada uno de dichos anticuerpos anti-TNF seleccionado usado como compuesto patrón interno seleccionado de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, y

- la serie o el conjunto de muestras de calibración se preparan para cubrir un intervalo de cantidades de los anticuerpos anti-TNF abarcando al menos el intervalo de cantidades del/de los anticuerpo(s) anti-TNF del/de los que se espera que esté(n) contenido(s) en una muestra de prueba.

Con fines de claridad, cada muestra de calibración comprende la misma cantidad fija y conocida del compuesto patrón interno seleccionado.

De manera ilustrativa, el intervalo de cantidades del anticuerpo anti-TNF seleccionado que se cubre mediante la serie o el conjunto de muestras de calibración, cuando se expresa como concentración final en las muestras de calibración, puede oscilar entre 0,1 µg/ml y 100 µg/ml. Por ejemplo, una serie o un conjunto de muestras de



calibración puede comprender ocho muestras de calibración que comprenden un anticuerpo anti-TNF de interés a respectivas concentraciones finales de 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml y 100 µg/ml.

5 Por tanto, según el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, puede generarse una curva de calibración para cada del anticuerpo anti-TNF de interés, y más precisamente para cada anticuerpo anti-TNF seleccionado de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab.

10 En otras realizaciones, puede generarse simultáneamente una curva de calibración para una pluralidad de anticuerpos anti-TNF, especialmente para una pluralidad de anticuerpos anti-TNF seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab. Según estas realizaciones, una serie de muestras de calibración, conteniendo cada muestra de calibración (i) una pluralidad de anticuerpos anti-TNF no marcados, especialmente para una pluralidad de anticuerpos anti-TNF seleccionados de un grupo que comprende  
15 infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, estando cada anticuerpo anti-TNF a una concentración dada, y (ii) la forma marcada correspondiente (lo más preferiblemente anticuerpos SIL) de cada uno de dichos anticuerpos anti-TNF a una concentración fija, y cubriendo la serie de muestras de calibración un intervalo de concentraciones (por ejemplo, de 0,1 µg/ml a 100 µg/ml) de dichos anticuerpos anti-TNF no marcados, y estando presente la misma concentración fija de los anticuerpos anti-TNF marcados correspondientes en cada una de las  
20 muestras de calibración (por ejemplo, una concentración fija de 20 µg/ml de cada uno de los anticuerpos anti-TNF marcados).

De manera ilustrativa, la cantidad dada del anticuerpo anti-TNF marcado seleccionado usado como compuesto patrón interno, especialmente la cantidad dada de anticuerpo marcado seleccionado de un grupo que comprende  
25 infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, es preferiblemente una cantidad que genera una señal de espectrometría de masas del mismo orden de magnitud que un patrón de calibración de intervalo medio del anticuerpo anti-TNF terapéutico correspondiente con el fin de limitar la diferencia en la intensidad de señal de espectrometría de masas generada por las respectivas cantidades (i) de péptidos sustitutos marcados derivados de proteólisis enzimática de dicho anticuerpo marcado anti-TNF usado como compuesto patrón interno y (ii) de los  
30 péptidos de proteólisis correspondientes derivados de dicho anticuerpo terapéutico anti-TNF. De manera ilustrativa, las razones de cantidad (por ejemplo, expresadas como cantidad en peso o como cantidades en peso/volumen) entre un anticuerpo anti-TNF no marcado y el anticuerpo anti-TNF marcado correspondiente puede oscilar entre 1:10 y 10:1, que abarca razones de cantidad que oscilan entre 1:5 y 5:1.

35 De hecho, la cantidad de anticuerpos anti-TNF que pueden encontrarse en una muestra de prueba, especialmente en una muestra de prueba que consiste en una muestra de suero humano que procede de un paciente tratado mediante anticuerpos anti-TNF, puede variar, dependiendo de (i) la cantidad de anticuerpo(s) anti-TNF que se ha(n) administrado a dicho paciente, (ii) el periodo de tiempo cuando se ha recogido la muestra de suero desde el periodo de tiempo de inicio del tratamiento, (iii) el periodo de tiempo de recogida de la muestra de suero desde la última  
40 administración de anticuerpos anti-TNF, y (iv) parámetros fisiológicos que pueden ser específicos para dicho paciente, tal como la tasa de aclaramiento de dichos anticuerpos desde la sangre.

En algunas realizaciones, la serie o el conjunto de muestras de calibración pueden comprender además una o más muestras de calibración control, que no contienen el anticuerpo anti-TNF seleccionado, o alternativamente que no  
45 contienen cualquier anticuerpo anti-TNF.

Lo más preferiblemente, una muestra de calibración se prepara partiendo de una muestra de fluido corporal inicialmente exenta del anticuerpo anti-TNF seleccionado o del compuesto patrón interno seleccionado, y preferiblemente suero o plasma de un mamífero no humano o de un individuo humano, y lo más preferiblemente  
50 suero humano o plasma humano.

Entonces, cada una de las muestras de calibración se somete a las mismas etapas de método que lo que se describe para la muestras de prueba en otra parte en la presente memoria descriptiva, para proporcionar una serie o un conjunto de muestras de ensayo de calibración (CAS, *calibration assay samples*).  
55

Entonces, cada muestra de ensayo de calibración se somete a análisis espectrométrico, y lo más preferiblemente a un análisis de CL-EM/EM, en las mismas condiciones que las descritas para la muestras de prueba en otra parte en la presente memoria descriptiva y entonces se miden los valores de las señales de espectrometría generadas mediante (i) un péptido sustituto seleccionado generado mediante proteólisis enzimática del anticuerpo anti-TNF  
60 seleccionado y (ii) mediante el péptido marcado seleccionado correspondiente (también denominado "péptido sustituto marcado") generado mediante la proteólisis enzimática del anticuerpo anti-TNF marcado seleccionado, especialmente mediante el péptido seleccionado correspondiente (también denominado "péptido sustituto marcado") generado mediante la proteólisis enzimática del anticuerpo anti-TNF marcado seleccionado, seleccionado de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, usado como compuesto patrón interno.  
65

Entonces, para cada una de las muestras de ensayo de calibración (CAS), se calcula una razón de (i) el valor de señal de espectrometría generado por el péptido sustituto de anticuerpo anti-TNF seleccionado con respecto a (ii) el valor de señal de espectrometría generado por el péptido sustituto marcado derivado de patrón interno seleccionado.

5 Tal como se detallará adicionalmente en la presente memoria descriptiva, un valor de señal espectrométrica puede consistir en el área pico de transiciones de SRM (monitorización de reacción seleccionada, *Selected Reaction Monitoring*) específicas, o de manera más precisa de la media de las áreas de pico de SRM específica, generada mediante un péptido de interés seleccionado, normalmente mediante un péptido tríptico sustituto seleccionado derivado del anticuerpo anti-TNF marcado seleccionado usado como el patrón interno descrito en el presente documento.

15 Por tanto, se proporciona una serie o un conjunto de valores de razón, calculándose cada valor de razón a partir de una muestra de ensayo de calibración obtenida de una muestra de calibración de partida que comprende cantidades conocidas, por ejemplo, concentraciones finales conocidas, del anticuerpo anti-TNF seleccionado y una cantidad fija y conocida del compuesto patrón interno.

20 Entonces puede generarse una curva de calibración representando gráficamente la serie o el conjunto de valores de razón calculados frente a las cantidades teóricas correspondientes del anticuerpo anti-TNF seleccionado, por ejemplo, frente a las concentraciones finales conocidas correspondientes del anticuerpo anti-TNF seleccionado.

25 Tal como se usa en el presente documento, una concentración "final" de un anticuerpo anti-TNF seleccionado es la concentración de dicho anticuerpo anti-TNF en una muestra de calibración inicial (CS, *Calibration Sample*), CS que comprende una cantidad añadida conocida de dicho anticuerpo anti-TNF.

#### Preparación de muestras

30 En algunas realizaciones, la muestra que se usa en el método de cuantificación procede de una muestra de sangre humana completa que se ha recogido previamente de un individuo. En realizaciones preferidas, las células sanguíneas, y especialmente los eritrocitos, se retiran mediante centrifugación para obtener una muestra de plasma. En otras realizaciones preferidas, se permite que se produzca la coagulación de la muestra de sangre completa y se obtiene una muestra de suero.

35 En realizaciones adicionales, la muestra que se usa en el método de cuantificación puede consistir en otros fluidos extracelulares, tales como fluido linfático (endolinfa o perilinf) y fluido intersticial.

40 Lo más preferiblemente, al menos para determinar el perfil farmacocinético de anticuerpos anti-TNF en un individuo, dicha muestra es una muestra de plasma sanguíneo o una muestra de suero sanguíneo, o una muestra derivada de plasma sanguíneo o suero sanguíneo.

En algunas realizaciones, la muestra inicial puede someterse a dilución, por ejemplo, en un medio acuoso, tal como en una solución salina o en una solución tampón, antes de usarse como muestra de ensayo en el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF según la invención.

45 Sin embargo, en la mayoría de realizaciones preferidas, la muestra inicial, tal como una muestra de plasma o una muestra de suero, se usa sin ningún pretratamiento y en particular se usa como tal sin diluir.

50 Tal como se describirá adicionalmente en la presente memoria descriptiva, según el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, la muestra que debe someterse a prueba se añade con una cantidad conocida de cada uno de los dos o más de los anticuerpos anti-TNF marcados seleccionados usados como compuestos patrón internos en la etapa a).

55 Por tanto, en estas realizaciones, se proporciona una muestra que contiene una cantidad conocida de cada uno de los dos o más de los anticuerpos anti-TNF marcados seleccionados usados como compuestos patrón internos y una cantidad desconocida de anticuerpos anti-TNF.

60 En algunas realizaciones, dicha muestra comprende solo dos compuestos patrón internos, que se seleccionan de entre anticuerpos anti-TNF de interés, y lo más preferiblemente solo dos compuestos patrón internos, que se seleccionan de un grupo que comprende infliximab marcado, etanercept marcado, adalimumab marcado, certolizumab marcado y golimumab marcado.

65 En otras realizaciones, dicha muestra comprende más de dos compuestos patrón internos, que se seleccionan de entre anticuerpos anti-TNF de interés y lo más preferiblemente más de dos compuestos patrón internos, que se seleccionan de un grupo que comprende infliximab marcado, etanercept marcado, adalimumab marcado, certolizumab marcado y golimumab marcado. Estas otras realizaciones abarcan aquellas en las que dicha muestra comprende 3, 4 o 5 compuestos patrón internos, que se seleccionan de entre anticuerpos anti-TNF de interés y lo

más preferiblemente 3, 4 o 5 compuestos patrón internos, que se seleccionan de un grupo que comprende infliximab marcado, etanercept marcado, adalimumab marcado, certolizumab marcado y golimumab marcado. Las diversas combinaciones de compuestos patrón internos que se añaden (o “se añaden de manera conocida”) se describen en otra parte en la presente memoria descriptiva.

5 Los compuestos patrón internos se someten a cada una de las etapas adicionales del método de cuantificación anti-TNF descrito en el presente documento.

10 En algunas realizaciones del método de cuantificación anti-TNF descrito en el presente documento, la etapa a) comprende las siguientes etapas:

15 a1) añadir a una muestra de prueba una cantidad conocida de dos o más anticuerpos anti-TNF marcados seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, mediante lo cual se proporciona una muestra de preproteólisis no concentrada, y

a2) enriquecer la muestra de preproteólisis no concentrada en anticuerpos, mediante lo cual se proporciona una muestra de preproteólisis.

#### 20 Preparación de una mezcla de preproteólisis

Por tanto, en la etapa a), o alternativamente en la etapa a2), se proporciona una mezcla de preproteólisis que contiene una cantidad conocida de compuestos patrón internos y una cantidad desconocida de anticuerpos anti-TNF.

25 En algunas de la mayoría de realizaciones preferidas, dicha mezcla de preproteólisis comprende dos o más anticuerpos anti-TNF marcados seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, como compuestos patrón internos.

#### 30 Enriquecimiento de la muestra en anticuerpos anti-TNF

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, la etapa a), o alternativamente la etapa a2), pueden consistir en una etapa en la que el enriquecimiento en anticuerpos anti-TNF se realiza mediante inmunocaptura, es decir complejando los anticuerpos anti-TNF posiblemente presentes en la muestra de prueba con moléculas de TNF-alfa, y pudiendo purificarse complejos reversibles formados entre los anticuerpos anti-TNF y las moléculas de TNF-alfa y pudiendo disociarse y recogerse los anticuerpos anti-TNF complejados.

40 Estas realizaciones de la etapa a), o la etapa a2), del método de cuantificación pueden realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye cromatografía de afinidad e inmunocaptura. La cromatografía de afinidad y la inmunocaptura se basan ambas en el mismo principio técnico de unión y elución de los anticuerpos anti-TNF usando un sustrato en el que se inmovilizan ligandos de anticuerpos anti-TNF, preferiblemente un sustrato en el que se inmovilizan moléculas de TNF-alfa.

#### 45 Enriquecimiento de la muestra en anticuerpos anti-TNF mediante inmunocaptura

En algunas realizaciones ilustradas en los ejemplos en el presente documento, la muestra de prueba se enriquece en anticuerpos anti-TNF usando un método de inmunocaptura. Según estas realizaciones, el enriquecimiento en anticuerpos anti-TNF mediante agotamiento de proteínas distintas de anticuerpo se realiza usando un soporte de cromatografía de afinidad sobre el que se inmovilizan las moléculas de TNF-alfa. De manera más precisa, según este método, el TNF-alfa biotinilado se inmoviliza sobre un soporte y el soporte resultante se pone en contacto con la muestra de prueba que se ha añadido de manera conocida previamente para capturar las moléculas de unión a TNF que están presentes en la muestra de prueba añadida de manera conocida, que incluye (i) los dos o más anticuerpos anti-TNF marcados con isótopo estables (SIL) usados como patrones internos y (ii) los otros anticuerpos anti-TNF que están posiblemente presentes en la muestra de prueba antes de la adición de manera conocida de los anticuerpos anti-TNF SIL.

Entonces, los anticuerpos anti-TNF se eluyen del soporte cromatográfico y se recogen para su procesamiento adicional.

60 En algunas realizaciones preferidas, se hace uso de un método de inmunoensayo de espectrometría de masas (MSIA, *Mass Spectrometry Immuno-Assay*) inverso, tal como el denominado D.A.R.T.s, que emplea reactivos, incluyendo sustrato recubierto con estreptavidina que se comercializa por la empresa Thermo Scientific (San Diego, EE. UU.).

En algunas otras realizaciones preferidas, la inmunocaptura puede realizarse usando las perlas recubiertas con estreptavidina comercializadas con el nombre de Dynabeads™, tal como estreptavidina Dynabeads™ M-280 comercializada por la empresa InVitrogen (Cergy-Pontoise, Francia).

#### 5 Enriquecimiento en anticuerpos anti-TNF mediante el agotamiento de proteína distinta de anticuerpo

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, la etapa a), o alternativamente la etapa a2), pueden consistir en una etapa, en la que el enriquecimiento en anticuerpos anti-TNF se realiza mediante el agotamiento de una parte sustancial de las proteínas, excepto las proteínas de anticuerpo, que están contenidas inicialmente en la muestra de prueba.

La etapa de agotamiento de dicha parte sustancial de las proteínas puede consistir en una etapa de agotamiento de las proteínas, tal como una etapa de agotamiento diferencial de las proteínas, y preferentemente de una etapa de agotamiento de albúmina.

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos que se describe en el presente documento, la muestra de proteólisis no concentrada se somete a una etapa de agotamiento de las proteínas.

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos que se describe en el presente documento, la muestra de proteólisis no concentrada se somete a una etapa diferencial de agotamiento de las proteínas.

Una etapa de agotamiento diferencial se puede referir, preferentemente, a una precipitación diferencial de las proteínas distintas de albúmina, de acuerdo con sus características estructurales y bioquímicas. Por ejemplo, una etapa de agotamiento diferencial puede consistir en precipitar únicamente anticuerpos de un isotipo determinado, tales como anticuerpos IgG; o puede consistir en precipitar únicamente proteínas de un tamaño (o intervalo de tamaños) determinado, tales como proteínas de un tamaño inferior a 80 kDa o, como alternativa, superior a 80 kDa.

Una etapa de agotamiento diferencial puede proporcionar una muestra final que contenga esencialmente la(s) proteína(s) de interés (es decir, anticuerpos) y descartar proteína(s) que no sea(n) de interés con el fin de obtener una sensibilidad más elevada que mediante el agotamiento de la albúmina únicamente.

Sin embargo, el enriquecimiento general en anticuerpos de IgG usando un método de precipitación de proteínas plasmáticas presenta diversas desventajas. Un método de este tipo para la precipitación general de proteínas plasmáticas, aunque es simple, rápido, barato y permite el acceso a la medición de la fracción de proteína total, la mezcla enriquecida en proteínas plasmáticas resultante no está suficientemente enriquecida en IgG, lo que es perjudicial para la repetibilidad de la etapa posterior de proteólisis de tripsina, y finalmente es perjudicial para la exactitud del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF. En consecuencia, aunque puede usarse un método de precipitación de este tipo para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, una realización de preparación de muestras de este tipo no es la más preferida.

Según algunos aspectos de estas realizaciones, el agotamiento de proteínas distintas de anticuerpo puede realizarse usando resinas específicas que tienen afinidad para proteínas que se conocen en la técnica, tal como la resina azul Cibacron, que incluye la agarosa Cibacron-blue™ 3 GA comercializada de manera notable por la empresa Sigma-Aldrich (MI, EE. UU.).

Según algunos otros aspectos de estas realizaciones, el agotamiento de proteínas distintas de anticuerpo puede realizarse mediante la precipitación de una parte sustancial de las proteínas contenidas inicialmente en la muestra de prueba, excepto las proteínas de anticuerpo.

En algunas realizaciones del método de cuantificación descrito en el presente documento, la muestra, que comprende opcionalmente el compuesto patrón interno, se enriquece en anticuerpos de IgG.

En la técnica se conocen diversos métodos para enriquecer una muestra en anticuerpos de IgG.

En algunas realizaciones, el enriquecimiento en anticuerpos de IgG puede realizarse mediante precipitación con sulfato de amonio, usando métodos ampliamente conocidos en la técnica, para obtener una composición enriquecida en IgG.

Según aspectos adicionales de estas realizaciones, el agotamiento de proteínas distintas de anticuerpo puede realizarse mediante la precipitación de las proteínas de anticuerpo contenidas inicialmente en la muestra de prueba, tal como realizando la precipitación de anticuerpos con sulfato de amonio, por ejemplo, usando una disolución de sulfato de amonio saturada (30% v/v).

#### 65 Cromatografía con proteína A

En algunas realizaciones del método de cuantificación descrito en el presente documento, la muestra, que comprende opcionalmente el compuesto patrón interno, se enriquece en anticuerpos de IgG.

5 En algunas realizaciones, el enriquecimiento en anticuerpos de IgG puede realizarse mediante cromatografía de afinidad, que incluye el uso de sustratos de cromatografía sobre los que se han inmovilizado ligandos relevantes, tales como proteína A, proteína G o alternativamente anticuerpos que se unen a la parte Fc de anticuerpos de IgG, así como aptámeros de ácido nucleico o péptido que se unen a la parte Fc de anticuerpos de IgG.

10 La etapa de enriquecimiento en anticuerpos de IgG permite separar anticuerpos de otras proteínas plasmáticas abundantes y por tanto contribuye a mejorar la sensibilidad y reproducibilidad del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF.

15 Preferiblemente en el presente documento, se prefiere el enriquecimiento en anticuerpos de IgG usando cromatografía con proteína A o proteína G.

20 El enriquecimiento en IgG sometiendo la muestra a cromatografía con proteína A o proteína G permite el agotamiento de casi todas las proteínas plasmáticas, al tiempo que se retienen todos los anticuerpos de IgG contenidos inicialmente en la misma, que incluye todos los anticuerpos anti-TNF contenidos inicialmente en la misma.

Lo más preferiblemente, el enriquecimiento en anticuerpos de IgG se realiza mediante cromatografía con proteína A.

25 En las realizaciones en las que se usa cromatografía con proteína A, se realiza convencionalmente la elución de los anticuerpos de IgG retenidos a pH ácido, generalmente a un pH en el intervalo de 2-3, preferiblemente a un pH de 2,8. Entonces, la fracción que contiene la mayor parte de los anticuerpos de IgG puede recogerse mediante elución usando una disolución de ácido fórmico (0,5%-1% v/v) a un pH que oscila entre 1 y 3. Tras la evaporación del ácido fórmico, la muestra seca puede resuspenderse en un medio líquido que contiene bicarbonato de amonio a un pH que oscila entre 7 y 8, para su procesamiento adicional.

30 Por tanto, en estas realizaciones se proporciona una composición enriquecida en IgG que contiene una cantidad conocida de los compuestos patrón internos y una cantidad desconocida de anticuerpos anti-TNF.

Concentración de la composición enriquecida en IgG

35 En algunas realizaciones, y especialmente en realizaciones en las que la composición enriquecida en IgG se obtiene mediante una etapa de cromatografía en la que la dilución de la muestra es susceptible de producirse, dicha composición se somete entonces a una etapa de concentración, para proporcionar una composición enriquecida en IgG concentrada.

40 En estas realizaciones, la etapa de concentración puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo diálisis y filtración, por ejemplo, microfiltración o ultrafiltración.

45 En realizaciones preferidas, la etapa de concentración es una etapa de ultrafiltración, en la que se usa una membrana filtrante de un valor de punto de corte relevante.

De manera ilustrativa, la etapa de ultrafiltración puede realizarse usando una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de punto de corte de aproximadamente 100 kDa.

50 En las realizaciones en las que la etapa de concentración es una etapa de ultrafiltración, se realiza un intercambio de tampón durante la etapa de ultrafiltración para optimizar las condiciones de las etapas adicionales del método que se llevan a cabo. De manera destacable, el intercambio de tampón que puede realizarse durante la etapa de ultrafiltración permite obtener una composición enriquecida en IgG concentrada en la que la etapa posterior de proteólisis mediante tripsina se realizará de manera óptima.

55 Etapa de proteólisis

Esta etapa es la etapa b) del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF general descrito en el presente documento.

60 Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la etapa de proteólisis consiste en someter la mezcla de preproteólisis, que contiene los anticuerpos anti-TNF marcados (usados como compuestos patrón internos) y posiblemente los anticuerpos anti-TNF no marcados que deben cuantificarse, a una proteólisis enzimática para generar, de manera destacable, péptidos de proteólisis derivados de anticuerpos anti-TNF, concretamente (i) péptidos de proteólisis derivados de anticuerpos anti-TNF marcados generados a partir de los dos o más compuestos patrón internos añadidos en la etapa a) y péptidos de proteólisis derivados de anticuerpos anti-

TNF no marcados generados a partir de los anticuerpos anti-TNF no marcados que deben cuantificarse, si estos anticuerpos anti-TNF no marcados están presentes inicialmente en la muestra de prueba.

5 Pueden realizarse una pluralidad de realizaciones de una etapa de proteólisis. En particular, las enzimas de proteólisis, que también pueden denominarse proteasas en el presente documento, pueden seleccionarse de un amplio grupo de proteasas ampliamente conocidas en la técnica. Dado que el/los sitio(s) de escisión de cada proteasa conocida forma(n) parte del conocimiento técnico del experto en la técnica, la selección de una proteasa específica en la etapa b) está correlacionada con la monitorización posterior de los péptidos de proteólisis de anticuerpos anti-TNF resultantes esperados generados a partir de la misma, mediante análisis de espectrometría de masas.

En algunas realizaciones de la etapa de proteólisis que se ilustran en los ejemplos en el presente documento, la proteasa seleccionada presenta actividad tripsina.

15 En algunas otras realizaciones de la etapa de proteólisis que se ilustran en los ejemplos en el presente documento, la proteasa seleccionada presenta una actividad de selección como diana de bisagra.

#### Proteólisis de tripsina de una etapa

20 Según estas realizaciones de la etapa de proteólisis, se añade tripsina a la mezcla de preproteólisis, para generar (i) péptidos trípticos a partir de los anticuerpos anti-TNF contenidos inicialmente en la muestra de prueba y (ii) péptidos trípticos generados mediante la proteólisis de tripsina de los anticuerpos anti-TNF marcados usados como compuestos patrón internos. Los péptidos trípticos específicos derivados del anticuerpo monoclonal patrón interno pueden denominarse también "péptidos sustitutos" en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, la proteólisis de tripsina de una etapa se realiza usando tripsina como la única proteasa añadida.

30 En algunas otras realizaciones que se ilustran en los ejemplos en el presente documento, la proteólisis de tripsina de una etapa se realiza usando una combinación de tripsina y endoproteinasa Lys-C (también denominada "EndolysC" en el presente documento) como "proteasa". Según estas realizaciones, la combinación o mezcla de tripsina y endoproteinasa Lys-C contiene ventajosamente una razón de cantidad en peso de tripsina con respecto a EndolysC que oscila entre 0,1:1 y 20:1, abarcando una razón de cantidad en peso de desde 0,5:1 hasta 15:1, preferiblemente una razón de cantidad en peso que oscila entre 1:10:1. Tal como se conoce ampliamente en la técnica, la tripsina escinde las cadenas de péptido principalmente en el lado de carboxilo de los aminoácidos lisina y arginina, excepto cuando cualquiera de los mismos va seguido de prolina.

35 Tal como se conoce también ampliamente en la técnica EndolysC escinde las cadenas de péptido en el lado de carboxilo del aminoácido lisina.

40 La etapa de proteólisis se realiza preferiblemente en condiciones que son óptimas para:

(i) generar todos los péptidos trípticos sustituidos esperados, y

45 (ii) evitar la autólisis de tripsina.

Puede usarse una tripsina purificada que tiene una baja capacidad de autólisis. De manera ilustrativa, puede usarse una tripsina denominada Tripsina Gold® que está comercializada por la empresa Promega (Madison, WI, Estados Unidos).

50 Pueden alcanzarse condiciones de proteólisis óptimas usando una razón molar de tripsina/proteína total que oscila entre 1/100 y 1/1.

55 En la mayoría de realizaciones preferidas, la etapa de proteólisis se realiza en condiciones de no desnaturalización, es decir en condiciones que no provocan la desnaturalización de proteína. De manera destacable, la etapa de proteólisis se realiza en ausencia de un agente de desnaturalización de proteína, tal como urea o hidrocloreuro de guanidino.

60 La proteólisis en presencia de tripsina se realiza durante un periodo de tiempo que puede adaptarse de manera óptima por parte del experto en la técnica.

Ventajosamente, la proteólisis se realiza a 37°C durante un periodo de tiempo que oscila entre 0,5 horas y 15 horas, preferiblemente entre 1 hora y 10 horas, y lo más preferiblemente que oscila entre 2 horas y 4 horas. En algunas realizaciones, la proteólisis se realiza a 37°C durante la noche.

65

La etapa de proteólisis de una etapa se realiza a un pH de 6 o más. Además, la etapa de proteólisis de una etapa se realiza ventajosamente a un pH de menos de 8,5, preferiblemente a un pH de 8 o menos, que incluye a un pH de 7,5 o menos, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 7.

5 En la mayoría de realizaciones preferidas, la etapa de proteólisis de una etapa se realiza en condiciones de no desnaturalización, es decir en condiciones en las que no hay ninguna desnaturalización de las proteínas contenidas inicialmente en la muestra de preproteólisis.

10 En algunas realizaciones, la proteólisis se detiene mediante la acidificación de la mezcla resultante, por ejemplo, añadiendo un ácido apropiado, tal como ácido fórmico, para reducir el pH de dicha mezcla resultante por debajo de pH 6.

Proteólisis de tripsina de dos etapas

15 En algunas realizaciones, la etapa b) puede realizarse mediante una proteólisis de tripsina de dos etapas. En estas realizaciones, la etapa b) comprende dos etapas de proteólisis enzimática, concretamente la etapa b1) de proteólisis enzimática en condiciones de desnaturalización y la etapa b2) de proteólisis enzimática en condiciones de no desnaturalización, tal como se ilustra en los ejemplos en el presente documento.

20 La(s) enzima(s) que se usa(n) en las etapas b1) y b2) puede(n) ser la(s) misma(s) que las dadas a conocer para realizar la "proteólisis de tripsina de una etapa" especificada anteriormente.

25 En algunas realizaciones, la(s) enzima(s) que se usa(n) en la etapa b1) es/son la(s) misma(s) que la(s) que se usa(n) en la etapa b2). En algunas otras realizaciones, la(s) enzima(s) que se usa(n) en la etapa b1) es/son distinta(s) de la(s) que se usa(n) en la etapa b2).

30 Según el método de proteólisis de dos etapas, la etapa b1) consiste en una etapa de predigestión, en la que se pretende aumentar la sensibilidad de las proteínas contenidas en la muestra de preproteólisis, y principalmente la sensibilidad a tripsina de los anticuerpos (incluyendo los anticuerpos anti-TNF) contenidos en la muestra de preproteólisis.

35 La etapa b1) se realiza en condiciones de desnaturalización, de modo que en presencia de urea, ventajosamente a una concentración final que oscila entre 4 M y 0,1 M, preferiblemente a una concentración final de aproximadamente 4 M.

En algunas realizaciones, la etapa b1) se realiza usando una mezcla de proteasas de EndolysC y tripsina en una cantidad descrita de la realización de "proteólisis de tripsina de una etapa" anterior.

40 En algunas otras realizaciones, la etapa b1) se realiza usando Endolys C como la única proteasa. Según estas otras realizaciones, EndolysC está presente en la muestra resultante a una concentración final que oscila entre 0,01 µg/ml y 10 µg/ml.

45 En la etapa b1), la proteólisis se realiza durante un periodo de tiempo de 0,5 h a 6 h; ventajosamente de 0,75 h a 4 h, preferiblemente de 1 h a 3 h, y puede realizarse durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 h.

En la etapa b1), la proteólisis se realiza preferiblemente a 37°C.

50 En la etapa b1), la proteólisis se realiza a un pH de 6 o más. Además, la etapa de proteólisis de una etapa se realiza ventajosamente a un pH de menos de 8,5, preferiblemente a un pH de 8 o menos, que incluye a un pH de 7,5 o menos, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 7.

Además, la etapa b2) se realiza usando una mezcla de proteasas que comprende tripsina.

55 En algunas realizaciones, la etapa b2) se realiza usando una mezcla de proteasas de EndolysC y tripsina en una cantidad descrita en la realización de "proteólisis de tripsina de una etapa" anterior. En algunos aspectos de estas realizaciones, la mezcla de proteasas de EndolysC y tripsina se añade en la etapa b1) y preferiblemente no hay ninguna adición de proteasa o mezcla de proteasas adicional en la etapa b2), dado que dicha proteasa o mezcla de proteasas ya está presente en la concentración final apropiada en la muestra de predigestión obtenida al final de la etapa b1). Según estas realizaciones, la etapa b1) puede realizarse en condiciones en las que EndolysC es activa y tripsina es inactiva, y volviéndose la tripsina activa en la etapa b2) produciendo cambios en las condiciones fisicoquímicas de la muestra, de modo que añadiendo una composición tampón apropiada al principio de la etapa b2). De manera ilustrativa, puede añadirse solución tampón de bicarbonato de amonio a una concentración final apropiada al principio de la etapa b2).

En algunos otros aspectos de estas realizaciones, en las que la etapa b1) se realiza usando EndolysC, se añade una cantidad apropiada de tripsina al principio de la etapa b2), de modo que la muestra usada al principio de la etapa b2) comprende una mezcla de proteasas de EndolysC y tripsina, a la razón y concentración final deseadas.

- 5 En algunas otras realizaciones, la etapa b1) se realiza usando tripsina como la única proteasa añadida. Según estas otras realizaciones, preferiblemente no hay ninguna adición adicional de tripsina en la etapa b2).

Ventajosamente, la proteólisis en la etapa b2) se realiza a 37°C durante un periodo de tiempo que oscila entre 0,5 horas y 15 horas, preferiblemente entre 1 hora y 10 horas, y lo más preferiblemente que oscila entre 2 horas y 4 horas. En algunas realizaciones, la proteólisis se realiza a 37°C durante la noche.

La proteólisis de una etapa en la etapa b2) se realiza a un pH de 6 o más. Además, la etapa de proteólisis de una etapa se realiza ventajosamente a un pH de menos de 8,5, preferiblemente a un pH de 8 o menos, que incluye a un pH de 7,5 o menos, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 7.

#### 15 Proteólisis con una proteasa de selección como diana de bisagra

En algunas realizaciones de la etapa b), la proteólisis se realiza usando una proteasa de selección como diana de bisagra. Las proteasas de selección como diana de bisagra son proteasas conocidas que efectúan una escisión en una proteína de anticuerpo en la región bisagra para generar (i) dos regiones Fc de las cadenas pesadas y (ii) un resto F(ab')<sub>2</sub>, respectivamente. Los restos Fab pueden obtenerse entonces del resto F(ab')<sub>2</sub>, mediante métodos ampliamente conocidos por el experto en la técnica, tal como usando un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT).

En la etapa b), la proteasa de selección como diana de bisagra se selecciona preferiblemente de un grupo que comprende gelatinasa A (MMP-2) (Tamerius *et al.*, 1975, Int J Cancer, vol. 16: 456-464), estromielisina (MMP-3) (Tamerius *et al.*, 1975, Int J Cancer, vol. 16: 456-464; Tamerius *et al.*, 1976, J Immunol, vol. 116: 724-730; Reichert *et al.*, 2010, Mabs, vol. 2: 84-100), matrilisina (MMP-7) (Tamerius *et al.*, 1975, Int J Cancer, vol. 16: 456-464; Tamerius *et al.*, 1976, J Immunol, vol. 116: 724-730; Reichert *et al.*, 2010, Mabs, vol. 2: 84-100), gelatinasa B (MMP-9) (Reichert *et al.*, 2010, Mabs, vol. 2: 84-100), metaloelastasa de macrófagos (MMP-12) (Tamerius *et al.*, 1976, J Immunol, vol. 116: 724-730; Reichert *et al.*, 2010, Mabs, vol. 2: 84-100), colagenasa-3 (MMP-13) (Tamerius *et al.*, 1976, J Immunol, vol. 116: 724-730), cathepsina G (Reichert *et al.*, 2010, Mabs, vol. 2: 84-100), pseudolisina (Strohl *et al.*, 2009, Curr Opin Biotechnol, vol. 20: 685-691), mirabilisina, glutamilo endopeptidasa I (GluV8) (Tamerius *et al.*, 1976, J Immunol, vol. 116: 724-730; Reichert *et al.*, 2010, Mabs, vol. 2: 84-100), estreptopaína (SpeB) (Brezski *et al.*, 2010, mAbs, vol. 2:3: 212-220), trepolisina (Brezski *et al.*, 2010, mAbs, vol. 2:3: 212-220) y enzima degradadora de inmunoglobulina de *Streptococcus* (ideS) (Tamerius *et al.*, 1976, J Immunol, vol. 116: 724-730; Reichert *et al.*, 2010, Mabs, vol. 2: 84-100).

Lo más preferiblemente, estas realizaciones de la etapa b) se realizan usando enzima degradadora de inmunoglobulina de *Streptococcus* (ideS) como proteasas de selección como diana de bisagra. En estas realizaciones, puede usarse ideS que se inmoviliza sobre un soporte sólido apropiado, por ejemplo, un soporte de agarosa, tal como en el kit FragIT™ comercializado por la empresa Genovis (Luna, Suecia) o la empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos).

En la etapa b), la muestra de preproteólisis se somete a proteólisis con una proteasa ideS a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo que oscila entre 5 min y 96 horas, ventajosamente entre 10 min y 50 horas, que incluye un periodo de tiempo que oscila entre 1 hora y 5 horas.

La mezcla de proteólisis resultante puede recogerse mediante centrifugación y/o precipitación de proteína, antes de la suspensión, tal como se ilustra en los ejemplos en el presente documento.

#### 50 Cuantificación de anticuerpos anti-TNF mediante análisis de espectrometría de masas

Esta etapa abarca las etapas c) y d) del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF general descrito en el presente documento.

La etapa c) se realiza mediante espectrometría de masas, según técnicas de cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas que se conocen en la técnica.

Preferiblemente, la etapa c) se realiza según el método de cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM), tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento.

Preferiblemente, se usa un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) equipado con una fuente de ESI que funciona en modo de ion positivo y que usa el modo de modificación por reacción múltiple (MRM) para la cuantificación.

En algunas realizaciones, la cromatografía de líquidos se realiza con un sustrato de cromatografía de fase inversa.



Entonces, en algunas realizaciones, el estado de carga más abundante de (i) péptidos proteolíticos sustitutos seleccionados derivados de los anticuerpos anti-TNF marcados usados como compuestos patrón internos y de (ii) los péptidos proteolíticos derivados de los anticuerpos anti-TNF presentes inicialmente en la muestra de prueba se observan preferiblemente entre 200 *m/z* y 2000 *m/z* en la fuente de ionización ESI y se seleccionan y fragmentan.

En la etapa de cuantificación mediante espectrometría de masas, se investigan las transiciones de monitorización por reacción seleccionada (SRM) específicas de

(i) el/los péptido(s) proteolítico(s) sustituto(s) seleccionado(s) de un anticuerpo anti-TNF y de

(ii) el péptido proteolítico marcado correspondiente derivado del anticuerpo anti-TNF marcado correspondiente usado como uno de los compuestos patrón internos.

Tal como ya se ha mencionado en otra parte en la presente memoria descriptiva, realizando el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, en el que la etapa de proteólisis b) hace uso de tripsina como la única proteasa o como proteasa contenida en una mezcla de proteasas, el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan de un grupo que comprende:

- para *infiximab*: péptidos de SEQ ID NO. 1-8,

- para *etanercept*: péptidos de SEQ ID NO. 9-15,

- para *adalimumab*: péptidos de SEQ ID NO. 16-23,

- para *certolizumab*: péptidos de SEQ ID NO. 24-30, y

- para *golimumab*: péptidos de SEQ ID NO. 31-37.

En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasa que contiene tripsina y en las que una pareja marcada de *infiximab* se usa como compuesto patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para los que se determina una razón de señales de espectrometría de masas en la etapa c) puede variar desde 1 hasta 8, que abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 péptidos de proteólisis seleccionados.

En las realizaciones en las que se monitorizan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 1 y 2; SEQ ID NO. 1 y 3; SEQ ID NO. 1 y 4; SEQ ID NO. 1 y 5; SEQ ID NO. 1 y 6; SEQ ID NO. 1 y 7; SEQ ID NO. 1 y 8; SEQ ID NO. 2 y 3; SEQ ID NO. 2 y 4; SEQ ID NO. 2 y 5; SEQ ID NO. 2 y 6; SEQ ID NO. 2 y 7; SEQ ID NO. 2 y 8; SEQ ID NO. 3 y 4; SEQ ID NO. 3 y 5; SEQ ID NO. 3 y 6; SEQ ID NO. 3 y 7; SEQ ID NO. 3 y 8; SEQ ID NO. 4 y 5; SEQ ID NO. 4 y 6; SEQ ID NO. 4 y 7; SEQ ID NO. 4 y 8; SEQ ID NO. 5 y 6; SEQ ID NO. 5 y 7; SEQ ID NO. 5 y 8; SEQ ID NO. 6 y 7; y SEQ ID NO. 7 y 8.

En las realizaciones en las que se monitorizan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 1, 2 y 3; SEQ ID NO. 1, 2 y 4; SEQ ID NO. 1, 2 y 5; SEQ ID NO. 1, 2 y 6; SEQ ID NO. 1, 2 y 7; SEQ ID NO. 1, 2 y 8; SEQ ID NO. 1, 3 y 4; SEQ ID NO. 1, 3 y 5; SEQ ID NO. 1, 3 y 6; SEQ ID NO. 1, 3 y 7; SEQ ID NO. 1, 3 y 8; SEQ ID NO. 1, 4 y 5; SEQ ID NO. 1, 4 y 6; SEQ ID NO. 1, 4 y 7; SEQ ID NO. 1, 4 y 8; SEQ ID NO. 1, 5 y 6; SEQ ID NO. 1, 5 y 7; SEQ ID NO. 1, 5 y 8; SEQ ID NO. 1, 6 y 7; SEQ ID NO. 1, 6 y 8; SEQ ID NO. 1, 7 y 8; SEQ ID NO. 2, 3 y 4; SEQ ID NO. 2, 3 y 5; SEQ ID NO. 2, 3 y 6; SEQ ID NO. 2, 3 y 7; SEQ ID NO. 2, 3 y 8; SEQ ID NO. 2, 4 y 5; SEQ ID NO. 2, 4 y 6; SEQ ID NO. 2, 4 y 7; SEQ ID NO. 2, 4 y 8; SEQ ID NO. 2, 5 y 6; SEQ ID NO. 2, 5 y 7; SEQ ID NO. 2, 5 y 8; SEQ ID NO. 2, 6 y 7; SEQ ID NO. 2, 6 y 8; SEQ ID NO. 2, 7 y 8; SEQ ID NO. 3, 4, y 5; SEQ ID NO. 3, 4 y 6; SEQ ID NO. 3, 4 y 7; SEQ ID NO. 3, 4 y 8; SEQ ID NO. 3, 5 y 6; SEQ ID NO. 3, 5 y 7; SEQ ID NO. 3, 5 y 8; SEQ ID NO. 3, 6 y 7; SEQ ID NO. 3, 6 y 8; SEQ ID NO. 3, 7 y 8; SEQ ID NO. 4, 5 y 6; SEQ ID NO. 4, 5 y 7; SEQ ID NO. 4, 5 y 8; SEQ ID NO. 4, 6 y 7; SEQ ID NO. 4, 6 y 8; SEQ ID NO. 4, 7 y 8; SEQ ID NO. 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 5, 6 y 8; SEQ ID NO. 5, 7 y 8; SEQ ID NO. 6, 7 y 8.

En las realizaciones en las que se monitorizan cuatro péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 1, 2, 3 y 4; SEQ ID NO. 1, 2 y 3 y 5; SEQ ID NO. 1, 2, 3, y 6; SEQ ID NO. 1, 2, 3 y 7; SEQ ID NO. 1, 2, 3 y 8; SEQ ID NO. 1, 3, 4 y 5; SEQ ID NO. 1, 3, 4 y 6; SEQ ID NO. 1, 3, 4 y 7; SEQ ID NO. 1, 3, 4 y 8; SEQ ID NO. 1, 4, 5 y 6; SEQ ID NO. 1, 4, 5 y 7; SEQ ID NO. 1, 4, 5 y 8; SEQ ID NO. 1, 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 1, 5, 6 y 8; SEQ ID NO. 1, 5, 7 y 8; SEQ ID NO. 2, 3, 4 y 5; SEQ ID NO. 2, 3, 4 y 6; SEQ ID NO. 2, 3, 4 y 7; SEQ ID NO. 2, 3, 4 y 8; SEQ ID NO. 2, 4, 5 y 6; SEQ ID NO. 2, 4, 5 y 7; SEQ ID NO. 2, 4, 5 y 8; SEQ ID NO. 2, 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 2, 5, 6 y 8; SEQ ID NO. 2, 6, 7 y 8; SEQ ID NO. 3, 4, 5 y 6; SEQ ID NO. 3, 4, 5 y 7; SEQ ID NO. 3, 4, 5 y 8; SEQ ID NO. 3, 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 3, 5, 7 y 8; SEQ ID NO. 3, 6, 7 y 8; SEQ ID NO. 4, 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 4, 5, 6 y 8; SEQ ID NO. 4, 6, 7 y 8; SEQ ID NO. 5, 6, 7 y 8.

## ES 2 758 377 T3

En las realizaciones en las que se monitorizan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4 y 5; SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, y 6; SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4 y 7; SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4 y 8; SEQ ID NO. 1, 3, 4, 5 y 6; SEQ ID NO. 1, 3, 4, 5 y 7; SEQ ID NO. 1, 3, 4, 5 y 8; SEQ ID NO. 1, 4, 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 1, 4, 5, 6 y 8; SEQ ID NO. 1, 5, 6, 7 y 8; SEQ ID NO. 2, 3, 4, 5 y 6; SEQ ID NO. 2, 3, 4, 5 y 7; SEQ ID NO. 2, 3, 4, 5 y 8; SEQ ID NO. 2, 4, 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 2, 4, 5, 6 y 8; SEQ ID NO. 2, 5, 6, 7 y 8; SEQ ID NO. 3, 4, 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 3, 4, 5, 6 y 8; SEQ ID NO. 3, 5, 6, 7 y 8; SEQ ID NO. 4, 5, 6, 7 y 8.

En las realizaciones en las que se monitorizan seis péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 y 6; SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 y 7; SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 y 8; SEQ ID NO. 1, 3, 4, 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 1, 3, 4, 5, 6 y 8; SEQ ID NO. 1, 4, 5, 6, 7 y 8; SEQ ID NO. 2, 3, 4, 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 2, 3, 4, 5, 6 y 8; SEQ ID NO. 2, 4, 5, 6, 7 y 8; SEQ ID NO. 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

En las realizaciones en las que se monitorizan siete péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7; SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8; SEQ ID NO. 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8; SEQ ID NO. 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

En las realizaciones en las que se monitorizan ocho péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasa que contiene tripsina y en las que una pareja marcada de etanercept se usa como compuesto patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para los que se determina una razón de señales de espectrometría de masas en la etapa c) puede variar desde 1 hasta 7, que abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 péptidos de proteólisis seleccionados.

En las realizaciones en las que se monitorizan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 9 y 10; SEQ ID NO. 9 y 11; SEQ ID NO. 9 y 12; SEQ ID NO. 9 y 13; SEQ ID NO. 9 y 14; SEQ ID NO. 9 y 15; SEQ ID NO. 10 y 11; SEQ ID NO. 10 y 12; SEQ ID NO. 10 y 13; SEQ ID NO. 10 y 14; SEQ ID NO. 10 y 15; SEQ ID NO. 11 y 12; SEQ ID NO. 11 y 13; SEQ ID NO. 11 y 14; SEQ ID NO. 11 y 15; SEQ ID NO. 12 y 13; SEQ ID NO. 12 y 14; SEQ ID NO. 12 y 15; SEQ ID NO. 13 y 14; SEQ ID NO. 13 y 15.

En las realizaciones en las que se monitorizan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 9, 10 y 11; SEQ ID NO. 9, 10 y 12; SEQ ID NO. 9, 10 y 13; SEQ ID NO. 9, 10 y 14; SEQ ID NO. 9, 10 y 15; SEQ ID NO. 9, 11 y 12; SEQ ID NO. 9, 11 y 13; SEQ ID NO. 9, 11 y 14; SEQ ID NO. 9, 11 y 15; SEQ ID NO. 9, 12 y 13; SEQ ID NO. 9, 12 y 14; SEQ ID NO. 9, 12 y 15; SEQ ID NO. 9, 13 y 14; SEQ ID NO. 9, 13 y 15; SEQ ID NO. 9, 14 y 15; SEQ ID NO. 10, 11 y 12; SEQ ID NO. 10, 11 y 13; SEQ ID NO. 10, 11 y 14; SEQ ID NO. 10, 11 y 15; SEQ ID NO. 10, 12 y 13; SEQ ID NO. 10, 12 y 14; SEQ ID NO. 10, 12 y 15; SEQ ID NO. 10, 13 y 14; SEQ ID NO. 10, 13 y 15; SEQ ID NO. 10, 14 y 15; SEQ ID NO. 11, 12, y 13; SEQ ID NO. 11, 12 y 14; SEQ ID NO. 11, 12 y 15; SEQ ID NO. 11, 13 y 14; SEQ ID NO. 11, 13 y 15; SEQ ID NO. 11, 14 y 15; SEQ ID NO. 12, 13 y 14; SEQ ID NO. 12, 13 y 15; SEQ ID NO. 13, 14 y 15.

En las realizaciones en las que se monitorizan cuatro péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 9, 10, 11 y 12; SEQ ID NO. 9, 10, 11 y 13; SEQ ID NO. 9, 10, 11, y 14; SEQ ID NO. 9, 10, 11 y 15; SEQ ID NO. 9, 11, 12 y 13; SEQ ID NO. 9, 11, 12 y 14; SEQ ID NO. 9, 11, 12 y 15; SEQ ID NO. 9, 12, 13 y 14; SEQ ID NO. 9, 12, 13 y 15; SEQ ID NO. 9, 13, 14 y 15; SEQ ID NO. 10, 11, 12 y 13; SEQ ID NO. 10, 11, 12 y 14; SEQ ID NO. 10, 11, 12 y 15; SEQ ID NO. 10, 12, 13 y 14; SEQ ID NO. 10, 12, 13 y 15; SEQ ID NO. 10, 13, 14 y 15; SEQ ID NO. 11, 12, 13 y 14; SEQ ID NO. 11, 12, 13 y 15; SEQ ID NO. 11, 13, 14 y 15; SEQ ID NO. 12, 13, 14 y 15.

En las realizaciones en las que se monitorizan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 9, 10, 11, 12 y 13; SEQ ID NO. 9, 10, 11, 12, y 14; SEQ ID NO. 9, 10, 11, 12 y 15; SEQ ID NO. 9, 11, 12, 13 y 14; SEQ ID NO. 9, 11, 12, 13 y 15; SEQ ID NO. 9, 12, 13, 14 y 15; SEQ ID NO. 10, 11, 12, 13 y 14; SEQ ID NO. 10, 11, 12, 13 y 15; SEQ ID NO. 10, 12, 13, 14 y 15; SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14 y 15.

En las realizaciones en las que se monitorizan seis péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 9, 10, 11, 12, 13 y 14; SEQ ID NO. 9, 10, 11, 12, 13 y 15; SEQ ID NO. 9, 11, 12, 13, 14 y 15; SEQ ID NO. 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En las realizaciones en las que se monitorizan siete péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasa que contiene tripsina y en las que una pareja marcada de adalimumab se usa como compuesto patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para los que se determina una razón de señales de espectrometría de



## ES 2 758 377 T3

En las realizaciones en las que se monitorizan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 24 y 25; SEQ ID NO. 24 y 26; SEQ ID NO. 24 y 27; SEQ ID NO. 24 y 28; SEQ ID NO. 24 y 29; SEQ ID NO. 24 y 30; SEQ ID NO. 25 y 26; SEQ ID NO. 25 y 27; SEQ ID NO. 25 y 28; SEQ ID NO. 25 y 29; SEQ ID NO. 25 y 30; SEQ ID NO. 26 y 27; SEQ ID NO. 26 y 28; SEQ ID NO. 26 y 29; SEQ ID NO. 26 y 30; SEQ ID NO. 27 y 28; SEQ ID NO. 27 y 29; SEQ ID NO. 27 y 30; SEQ ID NO. 28 y 29; SEQ ID NO. 28 y 30; SEQ ID NO. 29 y 30.

En las realizaciones en las que se monitorizan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 24, 25 y 26; SEQ ID NO. 24, 25 y 27; SEQ ID NO. 24, 25 y 28; SEQ ID NO. 24, 25 y 29; SEQ ID NO. 24, 25 y 30; SEQ ID NO. 24, 26 y 27; SEQ ID NO. 24, 26 y 28; SEQ ID NO. 24, 26 y 29; SEQ ID NO. 24, 26 y 30; SEQ ID NO. 24, 27 y 28; SEQ ID NO. 24, 27 y 29; SEQ ID NO. 24, 27 y 30; SEQ ID NO. 24; 28 y 29; SEQ ID NO. 24, 28 y 30; SEQ ID NO. 24; 29 y 30; SEQ ID NO. 25, 26 y 27; SEQ ID NO. 25, 26 y 28; SEQ ID NO. 25, 26 y 29; SEQ ID NO. 25, 26 y 30; SEQ ID NO. 25, 27 y 28; SEQ ID NO. 25, 27 y 29; SEQ ID NO. 25, 27 y 30; SEQ ID NO. 25, 28 y 29; SEQ ID NO. 25, 28 y 30; SEQ ID NO. 25, 29 y 30; SEQ ID NO. 26, 27, y 28; SEQ ID NO. 26, 27 y 29; SEQ ID NO. 26, 27 y 30; SEQ ID NO. 26, 28 y 29; SEQ ID NO. 26, 28 y 30; SEQ ID NO. 26, 29 y 30; SEQ ID NO. 27, 28 y 29; SEQ ID NO. 27, 28 y 30; SEQ ID NO. 28, 29 y 30.

En las realizaciones en las que se monitorizan cuatro péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 24, 25, 26 y 27; SEQ ID NO. 24, 25, 26 y 28; SEQ ID NO. 24, 25, 26, y 29; SEQ ID NO. 24, 25, 26 y 30; SEQ ID NO. 24, 26, 27 y 28; SEQ ID NO. 24, 26, 27 y 29; SEQ ID NO. 24, 26, 27 y 30; SEQ ID NO. 24, 27, 28 y 29; SEQ ID NO. 24, 27, 28 y 30; SEQ ID NO. 24, 28, 29 y 30; SEQ ID NO. 25, 26, 27 y 28; SEQ ID NO. 25, 26, 27 y 29; SEQ ID NO. 25, 26, 27 y 30; SEQ ID NO. 25, 27, 28 y 29; SEQ ID NO. 25, 27, 28 y 30; SEQ ID NO. 25, 28, 29 y 30; SEQ ID NO. 26, 27, 28 y 29; SEQ ID NO. 26, 27, 28 y 30; SEQ ID NO. 26, 28, 29 y 30; SEQ ID NO. 27, 28, 29 y 30.

En las realizaciones en las que se monitorizan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 24, 25, 26, 27 y 28; SEQ ID NO. 24, 25, 26, 27, y 29; SEQ ID NO. 24, 25, 26, 27 y 30; SEQ ID NO. 24, 26, 27, 28 y 29; SEQ ID NO. 24, 26, 27, 28 y 30; SEQ ID NO. 24, 27, 28, 29 y 30; SEQ ID NO. 25, 26, 27, 28 y 29; SEQ ID NO. 25, 26, 27, 28 y 30; SEQ ID NO. 25, 27, 28 y 29; SEQ ID NO. 25, 27, 28 y 30; SEQ ID NO. 25, 28, 29 y 30; SEQ ID NO. 26, 27, 28 y 29; SEQ ID NO. 26, 27, 28 y 30; SEQ ID NO. 26, 28, 29 y 30.

En las realizaciones en las que se monitorizan seis péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 24, 25, 26, 27, 28 y 29; SEQ ID NO. 24, 25, 26, 27, 28 y 30; SEQ ID NO. 24, 26, 27, 28, 29 y 30; SEQ ID NO. 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

En las realizaciones en las que se monitorizan siete péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasa que contiene tripsina y en las que una pareja marcada de golimumab se usa como compuesto patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para los que se determina una razón de señales de espectrometría de masas en la etapa c) puede variar desde 1 hasta 7, que abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 péptidos de proteólisis seleccionados.

En las realizaciones en las que se monitorizan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 31 y 32; SEQ ID NO. 31 y 33; SEQ ID NO. 31 y 34; SEQ ID NO. 31 y 35; SEQ ID NO. 31 y 36; SEQ ID NO. 31 y 37; SEQ ID NO. 32 y 33; SEQ ID NO. 32 y 34; SEQ ID NO. 32 y 35; SEQ ID NO. 32 y 36; SEQ ID NO. 32 y 37; SEQ ID NO. 33 y 34; SEQ ID NO. 33 y 35; SEQ ID NO. 33 y 36; SEQ ID NO. 33 y 37; SEQ ID NO. 34 y 35; SEQ ID NO. 34 y 36; SEQ ID NO. 34 y 37; SEQ ID NO. 35 y 36; SEQ ID NO. 35 y 37; SEQ ID NO. 36 y 37.

En las realizaciones en las que se monitorizan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 31, 32 y 33; SEQ ID NO. 31, 32 y 34; SEQ ID NO. 31, 32 y 35; SEQ ID NO. 31, 32 y 36; SEQ ID NO. 31, 32 y 37; SEQ ID NO. 31, 33 y 34; SEQ ID NO. 31, 33 y 35; SEQ ID NO. 31, 33 y 36; SEQ ID NO. 31, 33 y 37; SEQ ID NO. 31, 34 y 35; SEQ ID NO. 31, 34 y 36; SEQ ID NO. 31, 34 y 37; SEQ ID NO. 31; 35 y 36; SEQ ID NO. 31, 35 y 37; SEQ ID NO. 31; 36 y 37; SEQ ID NO. 32, 33 y 34; SEQ ID NO. 32, 33 y 35; SEQ ID NO. 32, 33 y 36; SEQ ID NO. 32, 33 y 37; SEQ ID NO. 32, 34 y 35; SEQ ID NO. 32, 34 y 36; SEQ ID NO. 32, 34 y 37; SEQ ID NO. 32, 35 y 36; SEQ ID NO. 32, 35 y 37; SEQ ID NO. 32, 36 y 37; SEQ ID NO. 32, 36 y 37; SEQ ID NO. 33, 34, y 35; SEQ ID NO. 33, 34 y 36; SEQ ID NO. 33, 34 y 37; SEQ ID NO. 33, 35 y 36; SEQ ID NO. 33, 35 y 37; SEQ ID NO. 33, 36 y 37; SEQ ID NO. 34, 35 y 36; SEQ ID NO. 34, 35 y 37; SEQ ID NO. 35, 36 y 37.

En las realizaciones en las que se monitorizan cuatro péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 31, 32, 33 y 34; SEQ ID NO. 31, 32, 33 y 35; SEQ ID NO. 31, 32, 33, y 36; SEQ ID NO. 31, 32, 33 y 37; SEQ ID NO. 31, 33, 34 y 35; SEQ ID NO. 31, 33, 34 y 36; SEQ ID NO. 31, 33, 34 y 37; SEQ ID NO. 31, 34, 35 y 36; SEQ ID NO. 31, 34, 35 y 37; SEQ ID NO. 31, 35, 36 y 37; SEQ ID NO. 32, 33, 34 y 35; SEQ ID NO. 32, 33, 34 y 36; SEQ ID NO. 32, 33, 34 y 37; SEQ ID NO. 32, 34, 35 y 36; SEQ ID NO. 32, 34, 35 y 37; SEQ ID NO. 32, 35, 36 y 37; SEQ ID NO. 32, 35, 36 y 37; SEQ ID NO. 32, 36 y 37; SEQ ID NO. 33, 34 y 35; SEQ ID NO. 33, 34 y 36; SEQ ID NO. 33, 34 y 37; SEQ ID NO. 33, 35 y 36; SEQ ID NO. 33, 35 y 37; SEQ ID NO. 33, 36 y 37; SEQ ID NO. 34, 35 y 36; SEQ ID NO. 34, 35 y 37; SEQ ID NO. 35, 36 y 37.

34, 35 y 37; SEQ ID NO. 32, 35, 36 y 37; SEQ ID NO. 33, 34, 35 y 36; SEQ ID NO. 33, 34, 35 y 37; SEQ ID NO. 33, 35, 36 y 37; SEQ ID NO. 34, 35, 36 y 37.

5 En las realizaciones en las que se monitorizan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 31, 32, 33, 34 y 35; SEQ ID NO. 31, 32, 33, 34, y 36; SEQ ID NO. 31, 32, 33, 34 y 37; SEQ ID NO. 31, 33, 34, 35 y 36; SEQ ID NO. 31, 33, 34, 35 y 37; SEQ ID NO. 31, 34, 35, 36 y 37; SEQ ID NO. 32, 33, 34, 35 y 36; SEQ ID NO. 32, 33, 34, 35 y 37; SEQ ID NO. 32, 34, 35, 36 y 37; SEQ ID NO. 33, 34, 35, 36 y 37.

10 En las realizaciones en las que se monitorizan seis péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 31, 32, 33, 34, 35 y 36; SEQ ID NO. 31, 32, 33, 34, 35 y 37, SEQ ID NO. 31, 33, 34, 35, 36 y 37; SEQ ID NO. 32, 33, 34, 35, 36 y 37.

15 En las realizaciones en las que se monitorizan siete péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse de un grupo que comprende SEQ ID NO. 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37.

20 Para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de la invención, en el que la etapa de proteólisis b) hace uso de una proteasa de selección como diana de bisagra, el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan de un grupo que comprende:

- *para infliximab*: péptidos de SEQ ID NO. 38-39,

- *para etanercept*: péptido de SEQ ID NO. 40,

25 - *para adalimumab*: péptidos de SEQ ID NO. 41-42,

- *para certolizumab*: péptidos de SEQ ID NO. 43-44, y

30 - *para golimumab*: péptidos de SEQ ID NO. 45-46.

En algunas realizaciones, en las que la etapa de proteólisis se realiza usando una proteasa de selección como diana de bisagra y en las que una pareja marcada de infliximab se usa como compuesto patrón interno, se determinan las señales espectrométricas de uno o ambos de los péptidos de proteólisis seleccionados de SEQ ID NO. 38-39.

35 En algunas realizaciones, en las que la etapa de proteólisis se realiza usando una proteasa de selección como diana de bisagra y en las que una pareja marcada de etanercept se usa como compuesto patrón interno, se determinan las señales espectrométricas de los péptidos de proteólisis seleccionados de SEQ ID NO. 40.

40 En algunas realizaciones, en las que la etapa de proteólisis se realiza usando una proteasa de selección como diana de bisagra y en las que una pareja marcada de adalimumab se usa como compuesto patrón interno, se determinan las señales espectrométricas de uno o ambos de los péptidos de proteólisis seleccionados de SEQ ID NO. 41-42.

45 En algunas realizaciones, en las que la etapa de proteólisis se realiza usando una proteasa de selección como diana de bisagra y en las que una pareja marcada de certolizumab se usa como compuesto patrón interno, se determinan las señales espectrométricas de uno o ambos de los péptidos de proteólisis seleccionados de SEQ ID NO. 43-44.

50 En algunas realizaciones, en las que la etapa de proteólisis se realiza usando una proteasa de selección como diana de bisagra y en las que una pareja marcada de golimumab se usa como compuesto patrón interno, se determinan las señales espectrométricas de uno o ambos de los péptidos de proteólisis seleccionados de SEQ ID NO. 45-46.

55 Las transiciones de SRM de péptidos proteolíticos seleccionados de los anticuerpos anti-TNF sometidos a prueba, de péptidos marcados proteolíticos de los dos o más anticuerpos anti-TNF usados como compuestos patrón internos se establecen preferiblemente tras comparar los espectros de fragmentación obtenidos de disoluciones puras de cada uno de estos péptidos, con espectros de fragmentación *in silico* generados con una herramienta de software disponible relevante, tal como el software comercializado con el nombre Skyline™ de MacCoss Lab Software (EE. UU.) y la herramienta de bioinformática ESP Predictor disponible de Genepattern (Vincent A. Fusaro, D. R. Mani, Jill págs. Mesirov y Steven A. Carr, Nature Biotechnology (2009) 27:190-198), disponible de manera destacable del Broad Institute (EE. UU.)

60 Preferiblemente, en la etapa d), la cuantificación de anticuerpos anti-TNF se basa en la razón de la media de las áreas de pico de SRM específica de un anticuerpo anti-TNF seleccionado y la media de las áreas de pico del péptido marcado sustituto seleccionado de patrón interno.

65 De manera más precisa, la cantidad de anticuerpos anti-TNF en la muestra sometida a prueba, por ejemplo, la concentración de dichos anticuerpos anti-TNF en la muestra de prueba, se determina notificando el valor de razón

que se calcula en la etapa d) para dicha muestra de prueba a una curva de calibración que se generó la como se describió previamente en otra parte en la presente memoria descriptiva.

5 Tal como se muestra en los ejemplos, la cuantificación descrita en el presente documento permite la linealidad entre la cantidad medida (por ejemplo, concentración) de un anticuerpo anti-TNF y la cantidad esperada del mismo.

10 Cuantificar anticuerpos anti-TNF con el método de cuantificación descrito en el presente documento permite una alta precisión de cuantificación, una alta repetibilidad de cuantificación, así como una cuantificación de anticuerpos anti-TNF por un amplio intervalo de cantidades.

15 El método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF según la invención permite una linealidad de la medida de cuantificación de desde 1 µg/ml o menos hasta 1000 µg/ml o más.

20 Por tanto, según directrices de la Administración de Alimentos y Medicamentos/Agencia Europea de Medicinas (FDA/EMA, por sus siglas en inglés) para la validación de un método bioanalítico, en el presente documento se muestra que el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF según la invención es al mismo tiempo suficientemente sensible y reproducible para cuantificar anticuerpos anti-TNF en muestras de plasma humano. Puede hacer referencia a las directrices "Guidance for Industry – Bioanalytical Method validation" del departamento estadounidense de Salud y Servicios Sociales – Administración de Alimentos y Medicamentos (2001); y las directrices de calidad correspondientes de la EMA.

La presente invención se refiere también a kits para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF que se describe a lo largo de la presente memoria descriptiva.

25 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a kits que comprenden dos o más anticuerpos anti-TNF marcados isotópicamente estables; para cuantificar anticuerpos anti-TNF en un individuo humano o una muestra de un individuo humano.

30 La presente invención también se refiere a kits que comprenden dos o más anticuerpos anti-TNF marcados isotópicamente estables; para cuantificar anticuerpos anti-TNF terapéuticos en un individuo humano o una muestra de un individuo humano.

35 En algunas realizaciones, un kit según la invención comprende dos o más anticuerpos anti-TNF marcados isotópicamente estables, especialmente dos o más anticuerpos anti-TNF marcados isotópicamente estables seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab. Los anticuerpos SIL pueden estar contenidos en un kit según la invención en cualquier combinación, especialmente en cualquier de las combinaciones que se describen en otra parte en la presente memoria descriptiva.

40 En algunas realizaciones, dicho kit comprende dos anticuerpos anti-TNF SIL seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab. En algunas realizaciones, dicho kit comprende tres anticuerpos anti-TNF SIL seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab. En algunas realizaciones, dicho kit comprende cuatro anticuerpos anti-TNF SIL seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab. En algunas realizaciones, dicho kit comprende cinco anticuerpos anti-TNF SIL seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab.

45 En algunas realizaciones, los anticuerpos SIL contenidos en un kit según la invención puede estar en forma de una suspensión líquida. En algunas otras realizaciones, los anticuerpos SIL contenidos en un kit según la invención pueden estar en forma liofilizada.

50 En algunas realizaciones, dicho kit comprende además reactivos requeridos para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, tal como una proteasa apropiada, especialmente una proteasa seleccionada de un grupo que comprende (i) tripsina o una composición que contiene tripsina y (ii) una proteasa de selección como diana de bisagra.

55 En algunas realizaciones, dicho kit también comprende información que proporcionan las curvas de calibración para cada uno de los anticuerpos anti-TNF contenidos en el mismo.

60 La presente invención se ilustra adicionalmente, sin limitarse a la misma, mediante los ejemplos a continuación.

## **Ejemplos**

### **A. Materiales y métodos**

65 **A.1. Preparación de muestras de prueba**

La muestra de prueba es una muestra de plasma o una muestra de suero que se recogió previamente de un paciente que debe someterse a prueba.

5 Patrón PSAQ de Acm de infliximab se añade de manera conocida en la muestra de prueba a una concentración final que está comprendida preferiblemente entre 5 µg/ml y 50 µg/ml, más preferiblemente entre 10 µg/ml y 25 µg/ml (de manera ideal 20 µg/ml).

10 El volumen de muestra usado para el experimento está comprendido entre 5 µl y 1000 µl, más preferiblemente entre 10 µl y 100 µl, y de manera ideal es 10 µl.

A 10 µl de muestra de suero (hasta 50 µl), añadir el patrón de infliximab marcado a una concentración de 25 µg/ml (por ejemplo, añadir 1 µl de una disolución [250 ng/µl]). Añadir PBS 1X para obtener un volumen de muestra final de 100 µl.

## 15 A.2. Agotamiento de proteínas distintas de anticuerpo mediante cromatografía de afinidad

20 Según esta realización, el agotamiento de proteínas distintas de anticuerpo se realiza usando un soporte de cromatografía de afinidad sobre el que se inmovilizó TNF-alfa. De manera más precisa, según este método, se añade TNF-alfa biotinilado a la muestra de prueba que se añade de manera conocida previamente para capturar las moléculas de unión a TNF que están presentes en la muestra de prueba añadida de manera conocida, incluyendo (i) los anticuerpos anti-TNF marcados con isótopo estables (SIL) usados como patrones internos y (ii) los otros anticuerpos anti-TNF que están presentes posiblemente en la muestra de prueba antes de la adición conocida con los anticuerpos anti-TNF SIL.

25 Entonces, la mezcla resultante se pone en contacto con un soporte cromatográfico sobre el que se inmovilizó estreptavidina, para capturar el TNF-alfa biotinilado que está posiblemente complejo con anticuerpos anti-TNF marcados y posiblemente no marcados.

30 Entonces, los anticuerpos anti-TNF se eluyen del soporte cromatográfico para su procesamiento adicional.

Este método puede denominarse MSIA (para inmunoensayo de espectrometría de masas).

### *Reactivos e instrumentos específicos*

35 Novus I Finnpiquette de 12 canales, 20-300 µl (Thermo), estreptavidina MSIA DARTs (Thermo), TNF-α biotinilado (ACRO biosystems), Remicade (Janssen Biologics), solución salina tamponada con fosfato (Gibco LifeSciences), disolución de hidróxido de amonio (SIGMA-Aldrich), Acetonitrilo CL-EM Chromasolv (Sigma-Aldrich), ácido fórmico Aristar (VWR), mezcla de EndoLysC/tripsina PROMEGA.

### 40 *Preparación de la disolución de TNF-alfa biotinilado*

Disolver 2,5 µg de TNF-alfa biotinilado en 100 µl de PBS.

### 45 *Experimento de MSIA*

Programar la siguiente etapa en el programa de MSIA:

Cargar puntas de estreptavidina MSIA en la pipeta.

50 Para la siguiente etapa, es muy importante evitar burbujas de aire en la resina. Para evitar burbujas, ajustar el soporte y la pipeta para que las puntas se sumerjan siempre en la disolución a lo largo del experimento.

Seleccionar la etapa LAVADO y lavar las puntas con PBS1X (volumen de PBS requerido = 200 µl).

55 Seleccionar la etapa CAPTURA 1 y aspirar la disolución de TNF-alfa biotinilado.

Seleccionar la etapa LAVADO y enjuagar las puntas con PBS1X (volumen de PBS requerido = 200 µl).

Repetir esta etapa dos veces.

60 Seleccionar la etapa CAPTURA 2 y aspirar la muestra de suero disolución.

Seleccionar la etapa LAVADO y enjuagar las puntas con disolución de hidróxido de amonio (volumen requerido = 200 µl). Repetir esta etapa y entonces LAVADO con agua ultrapura 200 mM. Repetir esta etapa dos veces.

65

Seleccionar la etapa ELUCIÓN y eluir con disolución de acetonitrilo al 30%/ácido fórmico al 0,05% (volumen mínimo requerido = 100 µl).

Recuperar el eluato en un tubo de baja adsorción y secar la muestra con un vacío de velocidad.

5

### A.3. Etapa de proteólisis enzimática

La etapa de proteólisis enzimática puede realizarse según una pluralidad de realizaciones. En algunas realizaciones, la proteólisis enzimática se realiza a través de un método que comprende dos etapas de digestión de tripsina, (i) una etapa de digestión de tripsina en condiciones de desnaturalización seguida de (ii) una etapa de digestión de tripsina en condiciones de no desnaturalización, método que se denomina "opción 1" a continuación en el presente documento. En algunas otras realizaciones, la proteólisis enzimática se realiza a través de un método que comprende una etapa de digestión de tripsina en condiciones de no desnaturalización, método que se denomina "opción 2" a continuación en el presente documento. En todavía otras realizaciones, la proteólisis enzimática se realiza usando una proteasa de selección como diana de bisagra tal como ideS (enzima degradadora de inmunoglobulina de *Streptococcus*), método que se denomina "opción 3" a continuación en el presente documento.

10

15

#### Opción 1: Digestión de tripsina de dos etapas

20

##### *Digestión de tripsina en condiciones de desnaturalización*

Tras estar completamente seco, añadir 10 µl de disolución de urea 4 M en el tubo y someter a remolino. Comprobar el pH de la muestra que debe ser > 6. Si no, ajustar el pH a 7-8 con disolución de base de Tris 0,5 M.

25

Añadir 2 µg de EndolysC de la mezcla de EndolysC/tripsina (la cantidad de EndolysC añadida puede variar entre 0,2 y 4 µg)

Proceder a la predigestión a 37°C durante 2 h.

30

##### *Digestión de tripsina en condiciones de no desnaturalización*

Añadir 190 µl de una disolución de bicarbonato de amonio 25 mM en el tubo, mezclar y añadir 2 µg de tripsina de la mezcla de EndolysC/tripsina (de nuevo la cantidad de EndolysC añadida puede variar entre 0,2 y 4 µg). Proceder a la digestión a 37°C durante 2-4 h o durante la noche si se prefiere.

35

Desalinizar y concentrar la muestra con una C18-ziptip (Proteabio), eluir la ziptip, secar el eluato.

Antes de la inyección, resuspender la muestra en 20 µl de una disolución de acetonitrilo al 2%, ácido fórmico al 0,1%.

40

Inyectar la muestra en el instrumento de CL-EM.

#### Opción 2: Digestión de tripsina de una etapa

45

Tras estar completamente seco, añadir 10 µl de disolución de bicarbonato de amonio 25 mM en el tubo y someter a remolino. Comprobar el pH de la muestra que debe ser > 6. Si no, ajustar el pH a 7-8 con disolución de base de Tris 0,5 M. Añadir 2 µg de tripsina de la mezcla de EndolysC/tripsina (de nuevo la cantidad de EndolysC añadida puede variar entre 0,2 y 4 µg). Proceder a la digestión a 37°C durante 2-4 h o durante la noche si se prefiere.

50

Añadir ácido fórmico en la muestra para detener la digestión para obtener una concentración final del 0,1%.

Inyectar la muestra en el instrumento de CL-EM.

#### Opción 3: Digestión de proteasa con IdeS

55

Tras estar completamente seco, resuspender la muestra en fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 o similar oscilando el pH entre 6,0-8,0 y comprobar el pH (ajustar con base de Tris si es necesario).

60

Romper el sello inferior de la columna FragIT™ (guardar la caperuza) y abrir ligeramente la tapa ~90° en contra de las agujas del reloj.

Poner la columna en un tubo de recogida de 1,5-2 ml y centrifugar la columna a 200×g durante 1 min para eliminar la solución de almacenamiento.

65

Equilibrar la columna añadiendo 300 µl de tampón de escisión y centrifugar la columna a 200×g durante 1 min.



Repetir las etapas 5 y 6 dos veces.

Poner la caperuza inferior sobre la columna.

5 Añadir inmediatamente la muestra que debe escindir en un volumen de 100 µl a una concentración máxima de 5 mg/ml de IgG en tampón de escisión. Sellar la columna con la tapa superior. Tener cuidado de suspender completamente los medios manualmente y asegurarse de que fluye en la columna. Incubar la columna mediante mezclado de extremo sobre extremo durante 15 min a temperatura ambiente. El tiempo de incubación puede aumentarse sin una sobredigestión de la IgG.

10 Retirar la tapa superior y la caperuza inferior. Poner la columna en un tubo de recogida de 1,5-2 ml. Centrifugar la columna a 1000×g durante 1 min para eluir la muestra. Para una recuperación máxima de la muestra, repetir dos veces esta etapa usando 100 µl de tampón de escisión. Centrifugar la columna a 1000×g durante 1 min para eluir la muestra. Juntar todas las fracciones de elución.

15 Si se requiere, usar una C4 ziptip para desalinizar la muestra o precipitar con acetona fría, secar y resuspender en ACN al 2%, tampón FA al 0,1%.

20 A.4. Análisis de CL-EM de muestras tratadas con la opción 1 o la opción 2 (digestión de tripsina)

Los siguientes péptidos de secuencias de SEQ ID NO. 1 a 37 deben monitorizarse en el ensayo de CL-SRM.

25 Estos péptidos deben monitorizarse en sus formas marcadas y no marcadas (el incremento de masa se calculará según el aminoácido marcado isotópicamente estable presente en la secuencia de péptido). También deben tenerse en cuenta potenciales modificaciones químicas que afectan a aminoácidos ya que estas modificaciones modificarán la m/z de iones de péptido y los fragmentos correspondientes.

A.5. Análisis de CL-EM de muestras tratadas con la opción 3 (digestión de IDES)

30 Los siguientes péptidos de secuencias SEQ ID NO. 39 a 46 deben monitorizarse en el ensayo de CL-SRM.

35 Estos péptidos deben monitorizarse en sus formas marcadas y no marcadas (el incremento de masa se calculará según el aminoácido marcado isotópicamente estable presente en la secuencia de péptido). También deben tenerse en cuenta potenciales modificaciones químicas que afectan a aminoácidos ya que estas modificaciones modificarán la m/z de iones de péptido y fragmentos correspondientes.

**Ejemplo 1: Evaluación de una curva de titulación para la cuantificación en muestras de suero humano del anticuerpo terapéutico infliximab en presencia de otros dos anticuerpos anti-TNF, usando una preparación de muestras basada en inmunocaptura (tecnología MSIA)**

40 El objetivo de este experimento era realizar una curva de titulación con el fin de evaluar los rendimientos de los patrones de anticuerpo marcado isotópicamente estable (SIL) y del método CL-EM/EM.

45 En el ejemplo 1, se realizó una curva de titulación usando (i) anticuerpos anti-TNF no marcados como compuestos patrón internos y (ii) infliximab SIL como anticuerpo anti-TNF que debe cuantificarse. De hecho, el mismo experimento puede realizarse usando (i) anticuerpos anti-TNF SIL como compuestos patrón internos y (ii) un infliximab no marcado como anticuerpo anti-TNF que debe cuantificarse.

A) Protocolo

50 Se generó una curva de titulación, según el siguiente protocolo 1) añadir a una muestra de suero una cantidad definida de anticuerpos anti-TNF terapéuticos, infliximab, adalimumab y etanercept y 2) añadir una cantidad aumentada de infliximab SIL. Por tanto, se denomina curva de titulación inversa, porque el infliximab SIL se cuantifica usando el infliximab terapéutico.

55 Un experimento de este tipo imita una situación en la que un paciente se habrá tratado con infliximab y cuyo suero se analizará usando nuestro método de CL-EM/EM y tres patrones anti-TNF.

60 Para realizar este experimento, se obtuvieron anticuerpos terapéuticos adalimumab, etanercept y infliximab de colaboradores. El infliximab SIL se produjo y purificó según el método descrito previamente (Lebert *et al.*, Bioanalysis, 2015). Se trataron las muestras usando los materiales y métodos descritos en la sección A. Se trataron las muestras siguiendo la opción 1 descrita en la sección A. Los péptidos de secuencias de SEQ ID NO. 1 a 23 se monitorizaron en el ensayo de CL-SRM, en sus formas marcadas y no marcadas.

65 Tabla 1: Muestras constituidas y analizadas para evaluar la exactitud y precisión de nuestro método de CL-EM/EM en un contexto en el que múltiples anti-TNF están presentes en la muestra.

Punto	1	2	3	4	5	Cero
Suero humano tratado	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Infliximab terapéutico	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
Adalimumab terapéutico	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
Etanercept terapéutico	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
Infliximab SIL	1 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	0 µg/ml
Volumen final de la muestra	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

### B) Resultados experimentales

Los rendimientos de cuantificación proporcionados por nuestro enfoque que combina el uso de patrones SIL de Acm y CL-EM/EM se evaluaron de una manera múltiplex, estando tres diferentes anticuerpos anti-TNF presentes simultáneamente en las muestras de suero humano. Para estas pruebas, hemos producido una curva de titulación inversa que cubre un intervalo de concentración de entre 1 µg/ml y 100 µg/ml. En este experimento, la exactitud obtenida para 10 µg/ml y 100 µg/ml estaba por debajo del 20%. Los resultados se representan en la Figura 1. La ecuación de regresión media era  $Y = 1,19X$  con un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0,999. Para cada punto de concentración, los datos obtenidos de los péptidos monitorizados eran consistentes, lo que indica que nuestro enfoque es robusto. La exactitud estaba por debajo del 20% y cumple los criterios de aceptación. La alta exactitud del método demuestra que es posible cuantificar con un alto grado de precisión un anticuerpo anti-TNF terapéutico presente en la sangre de un paciente usando un enfoque genérico y ciego, combinando el uso de un patrón de anticuerpo SIL y CL-EM.

Por tanto, el método puede aplicarse para el siguiente terapéutico personalizado de pacientes tratados con anticuerpos terapéuticos anti-TNF.

De manera más interesante, los resultados experimentales muestran que el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento no requiere una selección de un método de cuantificación específico para un anticuerpo tal como es el caso en la presente práctica habitual. Además, el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF permite corregir situaciones en las que el tratamiento de un paciente se documenta de manera errónea, y también permite determinar concentraciones de anticuerpos anti-TNF en muestras de prueba de pacientes que han experimentado tratamientos de terapia de combinación anti-TNF. Finalmente, el método de cuantificación anti-TNF no se ve afectado si el paciente ha recibido un primer tratamiento con anticuerpo anti-TNF y posteriormente un segundo tratamiento con un segundo anticuerpo anti-TNF distinto del primer anticuerpo.

### **Ejemplo 2: Evaluación de la concentración máxima de anticuerpos anti-TNF que pueden estar presentes en la muestra sin afectar a la captura de antígeno usando MSIA.**

El objetivo de este experimento era evaluar, usando un único anticuerpo anti-TNF, infliximab, la concentración máxima que puede medirse con exactitud usando nuestro enfoque de cuantificación anti-TNF.

#### A) Protocolo

Para realizar este experimento, se obtuvo anticuerpo terapéutico infliximab de colaboradores. El infliximab SIL se produjo y purificó según el método descrito previamente (Lebert *et al.*, Bioanalysis, 2015). Se trataron las muestras usando los materiales y métodos descritos en la sección A. Se trataron las muestras siguiendo la opción 1 descrita en la sección A. Los péptidos de secuencias de SEQ ID NO. 1 a 8 se monitorizaron en el ensayo de CL-SRM, en sus formas marcadas y no marcadas.

**Tabla 2:** Muestras constituidas y analizadas para evaluar la saturación del antígeno de TNF-alfa usando un enfoque de tecnología MSIA.

Punto	1	2	3	4
Suero humano	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Infliximab terapéutico	20 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
Infliximab SIL	40 µg/ml	40 µg/ml	40 µg/ml	40 µg/ml
Volumen final de la muestra	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

### B) Resultados experimentales

- El experimento realizado en este caso pretendía evaluar la concentración máxima de anti-TNF que podía medirse con exactitud usando el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento. Para limitar la complejidad, se evaluó usando un único anticuerpo anti-TNF, infliximab, que se añadió de manera conocida en suero humano a una concentración diferente que cubría un intervalo de entre 20 µg/ml y 200 µg/ml, mientras que el patrón de infliximab SIL se añadió de manera conocida en la misma muestra a una concentración relativamente alta de 40 µg/ml. Los resultados se representan en la Figura 2. Los resultados obtenidos muestran que la cuantificación de infliximab en estas condiciones es exacta y sigue siendo lineal cuando está presente infliximab terapéutico en la muestra a una concentración de 100 µg/ml y cuando se añade de manera conocida patrón de infliximab SIL a una concentración de 40 µg/ml. Con la curva lineal obtenida, incluso podemos extrapolar que será lineal y exacta cuando el infliximab terapéutico esté presente en la muestra a una concentración de 150 µg/ml y cuando el patrón de infliximab SIL se añada de manera conocida a una concentración de 40 µg/ml. Sin embargo, aparece un fenómeno de saturación cuando el infliximab terapéutico está presente en la muestra a una concentración de 200 µg/ml y cuando el patrón de infliximab SIL se añade de manera conocida a una concentración de 40 µg/ml. Estos resultados permiten concluir que el protocolo de MSIA descrito para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento con una técnica de MSIA permite medir con exactitud un anticuerpo terapéutico anti-TNF presente en una muestra de sangre humana a una concentración igual o inferior a 40 µg/ml usando hasta 5 anticuerpos anti-TNF SIL, cada uno añadido de manera conocida a una concentración de 20 µg/ml (total = 100 µg/ml) e incluso hasta 30 µg/ml (total = 150 µg/ml). Los resultados también muestran que el protocolo de MSIA, cuando se usa para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, permite medir con exactitud un anticuerpo terapéutico anti-TNF presente en una muestra de sangre humana a una concentración igual o inferior a 150 µg/ml usando hasta 2 anticuerpos anti-TNF SIL, cada uno añadido de manera conocida a una concentración de 20 µg/ml (concentración total de anticuerpos anti-TNF = 40 µg/ml).
- Estos resultados muestran que el protocolo de inmunofluorescencia de espectrometría de masas, que es una ilustración de realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en el presente documento, puede usarse para la cuantificación de anticuerpos anti-TNF usando múltiples patrones de anticuerpo anti-TNF SIL.

**Tabla 3: Secuencias**

SEQ ID NO.	Tipo	Descripción
1	Aminoácido	Péptido tríptico de infliximab
2	Aminoácido	Péptido tríptico de infliximab
3	Aminoácido	Péptido tríptico de infliximab
4	Aminoácido	Péptido tríptico de infliximab
5	Aminoácido	Péptido tríptico de infliximab
6	Aminoácido	Péptido tríptico de infliximab
7	Aminoácido	Péptido tríptico de infliximab
8	Aminoácido	Péptido tríptico de infliximab
9	Aminoácido	Péptido tríptico de etanercept
10	Aminoácido	Péptido tríptico de etanercept
11	Aminoácido	Péptido tríptico de etanercept
12	Aminoácido	Péptido tríptico de etanercept
13	Aminoácido	Péptido tríptico de etanercept
14	Aminoácido	Péptido tríptico de etanercept
15	Aminoácido	Péptido tríptico de etanercept
16	Aminoácido	Péptido tríptico de adalimumab
18	Aminoácido	Péptido tríptico de adalimumab
19	Aminoácido	Péptido tríptico de adalimumab
20	Aminoácido	Péptido tríptico de adalimumab
21	Aminoácido	Péptido tríptico de adalimumab
22	Aminoácido	Péptido tríptico de adalimumab
23	Aminoácido	Péptido tríptico de adalimumab
24	Aminoácido	Péptido tríptico de certolizumab

<b>SEQ ID NO.</b>	<b>Tipo</b>	<b>Descripción</b>
25	Aminoácido	Péptido tríptico de certolizumab
26	Aminoácido	Péptido tríptico de certolizumab
27	Aminoácido	Péptido tríptico de certolizumab
28	Aminoácido	Péptido tríptico de certolizumab
29	Aminoácido	Péptido tríptico de certolizumab
30	Aminoácido	Péptido tríptico de certolizumab
31	Aminoácido	Péptido tríptico de golimumab
32	Aminoácido	Péptido tríptico de golimumab
33	Aminoácido	Péptido tríptico de golimumab
34	Aminoácido	Péptido tríptico de golimumab
35	Aminoácido	Péptido tríptico de golimumab
36	Aminoácido	Péptido tríptico de golimumab
37	Aminoácido	Péptido tríptico de golimumab
38	Aminoácido	Péptido proteolítico de IdeS de infliximab (VH+CH1)
39	Aminoácido	Péptido proteolítico de IdeS de infliximab (VL+CL)
40	Aminoácido	Péptido proteolítico de IdeS de etanercept
41	Aminoácido	Péptido proteolítico de IdeS de adalimumab (VH+CH1)
42	Aminoácido	Péptido proteolítico de IdeS de adalimumab (VL+CL)
43	Aminoácido	Péptido proteolítico de IdeS de certolizumab (VH+CH1)
44	Aminoácido	Péptido proteolítico de IdeS de certolizumab (VL+CL)
45	Aminoácido	Péptido proteolítico de IdeS de golimumab (VH+CH1)
46	Aminoácido	Péptido proteolítico de IdeS de golimumab (VL+CL)
47	Aminoácido	Infliximab, cadena pesada
48	Aminoácido	Infliximab, cadena ligera
49	Aminoácido	Adalimumab, cadena pesada
50	Aminoácido	Adalimumab, cadena ligera
51	Aminoácido	Etanercept
52	Aminoácido	Certolizumab, cadena pesada
53	Aminoácido	Certolizumab, cadena ligera
54	Aminoácido	Golimumab, cadena pesada
55	Aminoácido	Golimumab, cadena ligera

Listado de secuencias

- <110> PROMISE ADVANCED PROTEOMICS
- 5 <120> Un método para cuantificar anticuerpos anti-TNF  
 <130> Documento PR73656
- 10 <150> EP15306759  
 <151> 2015-11-06
- <160> 55
- <170> BiSSAP 1.3
- 15 <210> 1  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab
- 25 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab
- <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab
- 30 <400> 1  
 Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys  
 1 5 10 15
- <210> 2  
 <211> 9
- 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab
- 40 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab
- 45 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab
- <400> 2  
 Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg  
 1 5
- 50 <210> 3  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab
- <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab
- 60 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab
- <400> 3

**Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys**  
**1 5 10**

5 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

15 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

<400> 4  
**Ser Ala Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg**  
**1 5 10**

20 <210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

30 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

35 <400> 5  
**Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Arg**  
**1 5 10**

40 <210> 6  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

50 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

<400> 6  
**Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly**  
**1 5 10 15**  
**Glu Arg**

55 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

<220>  
 5 <223> Péptido tríptico de infliximab

<400> 7  
 Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg  
 1 5 10 15

10 <210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

20 <220>  
 <223> Péptido tríptico de infliximab

<400> 8  
 Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg  
 1 5 10

25 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

35 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

40 <400> 9  
 Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Cys Arg

45 <210> 10  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

50 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

55 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<400> 10  
 Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys  
 1 5 10

60 <210> 11

<211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

10 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<400> 11  
**Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg**  
 1 5 10

15 <210> 12  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

25 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

30 <400> 12  
**Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys**  
 1 5 10

35 <210> 13  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

45 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<400> 13  
**Leu Cys Ala Pro Leu Arg**  
 1 5

50 <210> 14  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

60 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept



ES 2 758 377 T3

<400> 14  
 Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg  
 1 5 10 15

5 <210> 15  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

15 <220>  
 <223> Péptido tríptico de etanercept

<400> 15  
 Ser Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr  
 20 25 30  
 Gly Asp Glu Pro Lys  
 35

20 <210> 16  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

30 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

35 <400> 16  
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg  
 20

40 <210> 17  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

50 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

<400> 17  
 Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 20 25

55

<210> 18  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab  
 <220>  
 10 <223> Péptido tríptico de adalimumab  
 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab  
 15 <400> 18  
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg  
 20 25  
 <210> 19  
 <211> 6  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab  
 25 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab  
 <220>  
 30 <223> Péptido tríptico de adalimumab  
 <400> 19  
 Ala Ser Gln Gly Ile Arg  
 1 5  
 35 <210> 20  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab  
 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab  
 45 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab  
 <400> 20  
 Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 50 1 5 10  
 <210> 21  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab  
 60 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

5 <400> 21  
 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 1 5 10 15

<210> 22  
 <211> 29  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

15 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

<220>  
 20 <223> Péptido tríptico de adalimumab

<400> 22  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg  
 20 25

25 <210> 23  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

35 <220>  
 <223> Péptido tríptico de adalimumab

<400> 23  
 Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
 1 5 10

40 <210> 24  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

50 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

55 <400> 24  
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr Gly Met Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Val Arg

<210> 25

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

5 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

10 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

<400> 25  
 Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile  
 1 5 10 15  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 20

15 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

25 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

30 <400> 26  
 Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys  
 1 5

35 <210> 27  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

45 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

<400> 27  
 Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 1 5 10

50 <210> 28  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

60 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

ES 2 758 377 T3

<220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

<400> 28  
 Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 1 5 10 15  
 5 Gly Lys

<210> 29  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

15 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

20 <400> 29  
 Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg  
 1 5 10 15

<210> 30  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

30 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

35 <220>  
 <223> Péptido tríptico de certolizumab

<400> 30  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile  
 20 25 30  
 Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
 35 40

40 <210> 31  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab

50 <220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab

<220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab

55 <400> 31  
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Ala Met His  
 1 5 10 15  
 Trp Val Arg

<210> 32  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab  
 <220>  
 10 <223> Péptido tríptico de golimumab  
 <220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab  
 15 <400> 32  
 Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val Ala Phe Met Ser Tyr Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Asn Lys  
 20  
 <210> 33  
 <211> 31  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab  
 25 <220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab  
 <220>  
 30 <223> Péptido tríptico de golimumab  
 <400> 33  
 Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Ile  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 20 25 30  
 35 <210> 34  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab  
 <220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab  
 45 <220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab  
 <400> 34  
 Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 50 1 5 10 15  
 <210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido tríptico de golimumab

- <220>  
<223> Péptido tríptico de golimumab
- <220>  
5 <223> Péptido tríptico de golimumab
- <400> 35  
Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg  
1 5
- 10 <210> 36  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>  
<223> Péptido tríptico de golimumab
- <220>  
20 <223> Péptido tríptico de golimumab
- <220>  
<223> Péptido tríptico de golimumab
- <400> 36  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
1 5 10 15  
Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg  
20 25 30
- 25 <210> 37  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Péptido tríptico de golimumab
- 35 <220>  
<223> Péptido tríptico de golimumab
- <220>  
<223> Péptido tríptico de golimumab
- 40 <400> 37  
Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys  
1 5 10
- 45 <210> 38  
<211> 239  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
50 <223> Péptido proteolítico de IdeS de infliximab (VH+CH1)
- <220>  
<223> Péptido proteolítico de IdeS de infliximab (VH+CH1)
- 55 <220>  
<223> Péptido proteolítico de IdeS de infliximab (VH+CH1)
- <400> 38

ES 2 758 377 T3

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

- <210> 39
- 5 <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 10 <223> Péptido proteolítico de IdeS de infliximab (VL+CL)
  
- <220>
- <223> Péptido proteolítico de IdeS de infliximab (VL+CL)
  
- 15 <220>
- <223> Péptido proteolítico de IdeS de infliximab (VL+CL)
  
- <400> 39



ES 2 758 377 T3

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

<210> 40

<211> 256

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido proteolítico de IdeS de etanercept

<220>

<223> Péptido proteolítico de IdeS de etanercept

<220>

15 <223> Péptido proteolítico de IdeS de etanercept

<400> 40

ES 2 758 377 T3

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

<210> 41  
 <211> 240  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de adalimumab (VH+CH1)

10 <220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de adalimumab (VH+CH1)

15 <220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de adalimumab (VH+CH1)

<400> 41  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

ES 2 758 377 T3

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

<210> 42  
 <211> 214  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de adalimumab(VL+CL)

10 <220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de adalimumab(VL+CL)

15 <220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de adalimumab(VL+CL)

<400> 42  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

20 <210> 43  
 <211> 229

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Péptido proteolítico de IdeS de certolizumab (VH+CH1)

<220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de certolizumab (VH+CH1)

10 <220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de certolizumab (VH+CH1)

<400> 43  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Ala Ala  
 225

15 <210> 44  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de certolizumab (VL+CL)

25 <220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de certolizumab (VL+CL)

<220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de certolizumab (VL+CL)

30 <400> 44

ES 2 758 377 T3

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

<210> 45

<211> 246

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Péptido proteolítico de IdeS de golimumab (VH+CH1)

<220>

<223> Péptido proteolítico de IdeS de golimumab (VH+CH1)

15

<220>

<223> Péptido proteolítico de IdeS de golimumab (VH+CH1)

<400> 45

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

Met Asp Val Ile Ser Ser Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120 125  
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 145 150 155 160  
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 165 170 175  
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 180 185 190  
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys  
 210 215 220  
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 245

5 <210> 46  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de golimumab (VL+CL)

<220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de golimumab (VL+CL)

15 <220>  
 <223> Péptido proteolítico de IdeS de golimumab (VL+CL)

<400> 46  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro  
 85 90 95  
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala  
 100 105 110  
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
 115 120 125  
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
 130 135 140  
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 165 170 175  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
 180 185 190  
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
 195 200 205  
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

20 <210> 47  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Infliximab, cadena pesada

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Infliximab, cadena pesada

5

&lt;400&gt; 47

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn His  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala  
 65 70 75 80  
 Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Lys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro 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 Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 Gly Lys  
 450

&lt;210&gt; 48

10

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

15

&lt;223&gt; Infliximab, cadena ligera

<220>

<223> Infliximab, cadena ligera

5

<400> 48

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

<210> 49

<211> 451

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Adalimumab, cadena pesada

15

<220>

<223> Adalimumab, cadena pesada

<400> 49

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

20



ES 2 758 377 T3

35 40 45  
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile 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 Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys  
 450

<210> 50

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Adalimumab, cadena ligera

10

<220>

<223> Adalimumab, cadena ligera

<400> 50

ES 2 758 377 T3

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

<210> 51  
 <211> 467  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Etanercept

10 <220>  
 <223> Etanercept

<400> 51  
 Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys  
 20 25 30  
 Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr  
 35 40 45  
 Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu  
 50 55 60  
 Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys  
 85 90 95  
 Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys  
 100 105 110  
 Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala  
 115 120 125  
 Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro  
 130 135 140  
 Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His  
 145 150 155 160  
 15 Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala

ES 2 758 377 T3

165 170 175  
 Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val  
 180 185 190  
 His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr  
 195 200 205  
 Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly  
 210 215 220  
 Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys  
 225 230 240  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 245 250 255  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 260 265 270  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 275 280 285  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 290 295 300  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 305 310 315 320  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 325 330 335  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 340 345 350  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 355 360 365  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 370 375 380  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 385 390 395 400  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 405 410 415  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 420 425 430  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 435 440 445  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 450 455 460  
 Pro Gly Lys  
 465

<210> 52  
 <211> 229  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Certolizumab, cadena pesada

10 <220>  
 <223> Certolizumab, cadena pesada

<400> 52  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

15

ES 2 758 377 T3

Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Ala Ala  
 225

5 <210> 53  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Certolizumab, cadena ligera  
 <220>  
 <223> Certolizumab, cadena ligera

<400> 53  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

15 <210> 54  
 <211> 457  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Golimumab, cadena pesada  
 <220>  
 <223> Golimumab, cadena pesada

<400> 54  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly  
 100 105 110  
 Met Asp Val Ile Ser Ser Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120 125  
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 145 150 155 160  
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 165 170 175  
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 180 185 190  
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys  
 210 215 220  
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 245 250 255  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 260 265 270  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 275 280 285  
 Val 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 His  
 305 310 315 320  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 325 330 335  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 340 345 350  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 355 360 365  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 370 375 380  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 385 390 395 400  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 405 410 415  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 420 425 430  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 435 440 445  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455

5

<210> 55  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Golimumab, cadena ligera

15

<220>  
 <223> Golimumab, cadena ligera

ES 2 758 377 T3

<400> 55

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para cuantificar un anticuerpo anti-TNF terapéutico en una muestra de un individuo humano que comprende las etapas de:
- 5 a) añadir a una muestra de prueba que puede contener anticuerpos anti-TNF terapéuticos una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos anti-TNF seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, mediante lo cual se proporciona una muestra de preproteólisis,
- 10 b) someter la muestra de preproteólisis a una proteólisis enzimática, para proporcionar una muestra de proteólisis que comprende (i) péptidos marcados por proteólisis derivados de los anticuerpos anti-TNF marcados y (ii) péptidos de proteólisis derivados del anticuerpo anti-TNF contenido en la muestra de prueba,
- 15 c) determinar mediante análisis de espectrometría de masas la razón entre (i) uno o más péptidos marcados por proteólisis seleccionados y (ii) uno o más péptidos de proteólisis correspondientes derivados de dicho anticuerpo anti-TNF,
- 20 d) calcular a partir de la razón determinada en la etapa c) la cantidad de dicho anticuerpo anti-TNF en la muestra de prueba.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa b) comprende las siguientes etapas:
- b1) una etapa de proteólisis enzimática en condiciones de desnaturalización, y
- 25 b2) una etapa de proteólisis enzimática en condiciones de no desnaturalización.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la proteólisis enzimática se realiza en la etapa b) usando tripsina.
- 30 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, en el que el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan de un grupo que comprende:
- para *infliximab*: péptidos de SEQ ID NO. 1-8,
- 35 - para *etanercept*: péptidos de SEQ ID NO. 9-15,
- para *adalimumab*: péptidos de SEQ ID NO. 16-23,
- para *certolizumab*: péptidos de SEQ ID NO. 24-30, y
- 40 - para *golimumab*: péptidos de SEQ ID NO. 31-37.
5. El método según la reivindicación 1, en el que la proteólisis se realiza en la etapa b) incubando la muestra de preproteólisis con una proteasa de selección como diana de bisagra.
- 45 6. El método según la reivindicación 5, en el que la proteasa de selección como diana de bisagra se selecciona de un grupo que comprende gelatinasa A (MMP-2), estromielisina (MMP-3), matrilisina (MMP-7), gelatinasa B (MMP-9), metaloelastasa de macrófagos (MMP-12), colagenasa-3 (MMP-13), catepsina G, pseudolisina, mirabilisina, glutamilo endopeptidasa I (GluV8), estreptopaina (SpeB), trepolisina y enzima degradadora de inmunoglobulina de *Streptococcus* (ideS).
- 50 7. El método según la reivindicación 5, en el que la proteasa de selección como diana de bisagra es una enzima degradadora de inmunoglobulina de *Streptococcus* (ideS).
- 55 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan de un grupo que comprende:
- para *infliximab*: péptidos de SEQ ID NO. 38-39,
- 60 - para *etanercept*: péptido de SEQ ID NO. 40,
- para *adalimumab*: péptidos de SEQ ID NO. 41-42,
- para *certolizumab*: péptidos de SEQ ID NO. 43-44, y
- 65 - para *golimumab*: péptidos de SEQ ID NO. 45-46.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa a) comprende las siguientes etapas:
- 5 a1) añadir a una muestra de prueba una cantidad conocida de dos o más anticuerpos anti-TNF marcados seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab, mediante lo cual se proporciona una muestra de preproteólisis no concentrada, y
- 10 a2) enriquecer la muestra de preproteólisis no concentrada en anticuerpos, mediante lo cual se proporciona una muestra de preproteólisis.
10. El método según la reivindicación 9, en el que en la etapa a2), la muestra de proteólisis no concentrada se somete a una etapa de agotamiento de proteína, preferiblemente a una etapa de agotamiento de albúmina.
- 15 11. El método según la reivindicación 9, en el que en la etapa a2), la muestra de proteólisis no concentrada se somete a una etapa de inmunocaptura, preferiblemente a una etapa de inmunocaptura que usa un sustrato de afinidad sobre el que está inmovilizado TNF-alfa.
- 20 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la muestra de prueba es una muestra humana de un individuo al que se le ha administrado un anticuerpo anti-TNF seleccionado de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab.
- 25 13. Un kit para cuantificar anticuerpos anti-TNF que comprende dos o más anticuerpos anti-TNF marcados isotópicamente estables seleccionados de un grupo que comprende infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab.
- 30 14. El kit según la reivindicación 13, que comprende además una proteasa seleccionada de un grupo que comprende (i) tripsina o una composición que contiene tripsina y (ii) una proteasa de selección como diana de bisagra.
15. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, que comprende además información que proporcionan las curvas de calibración para cada uno de los anticuerpos anti-TNF contenidos en el mismo.



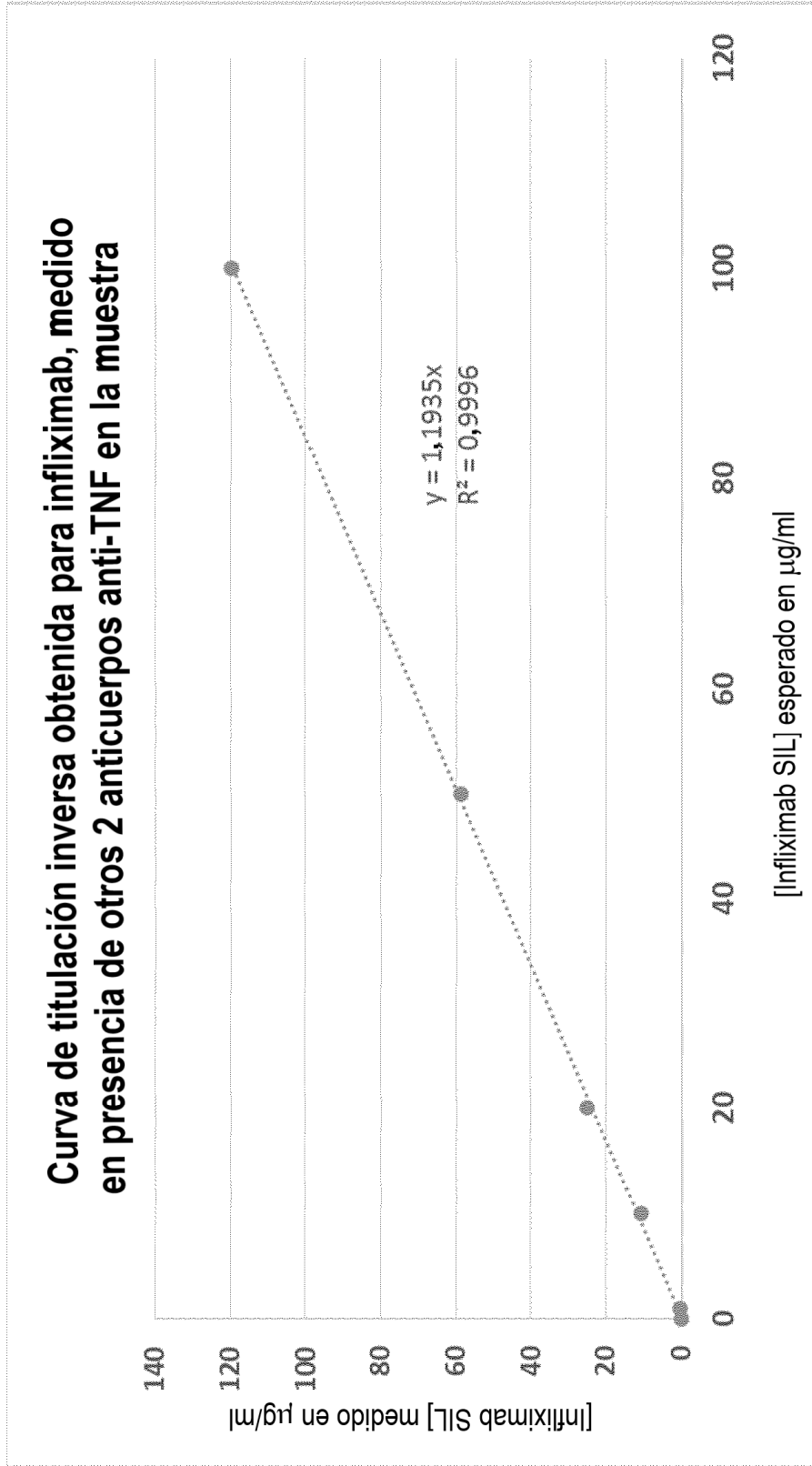
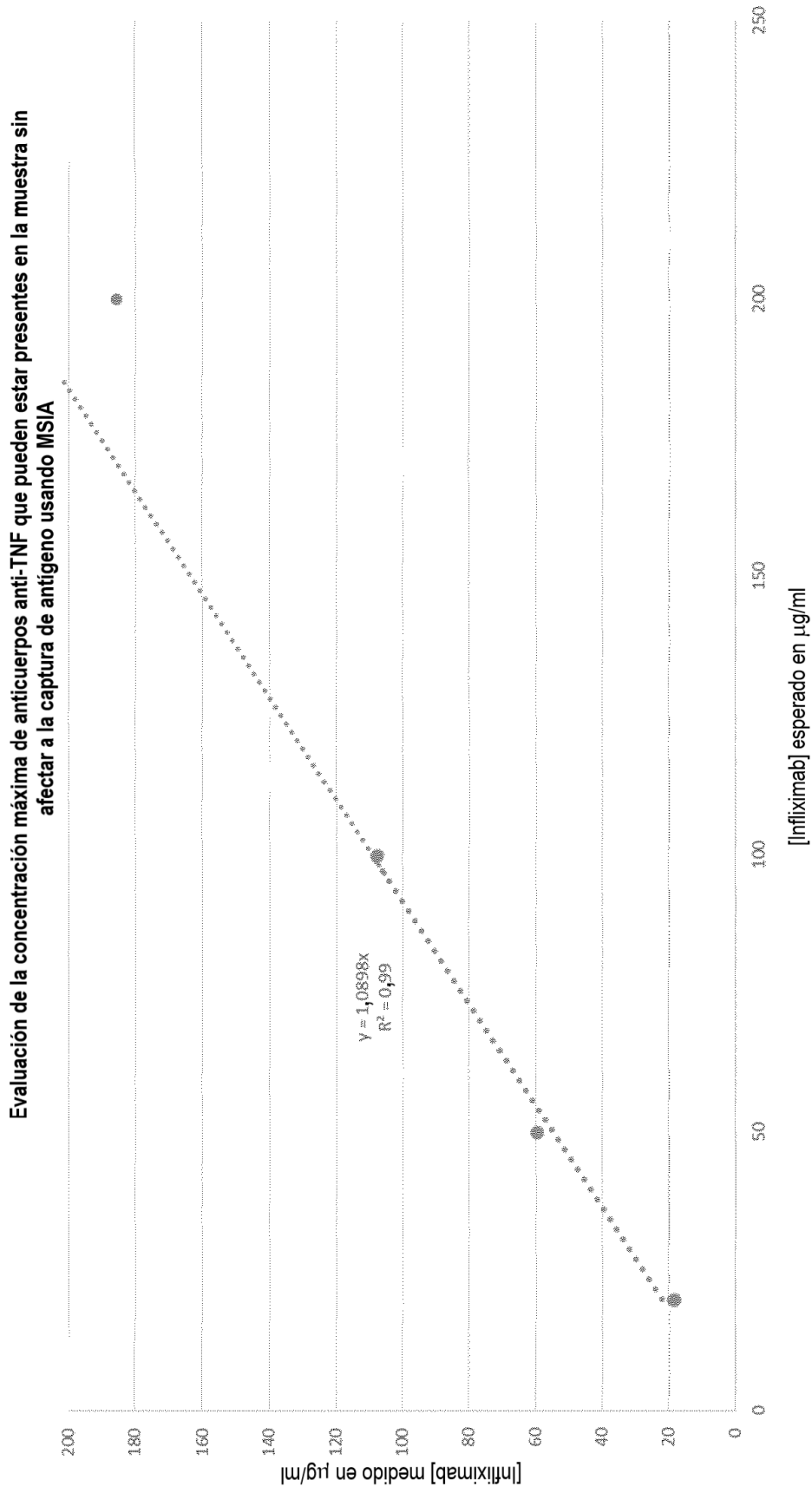


Figura 1



**Figura 2**