

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 224**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2015** E 15306767 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020** EP 3165922

54 Título: **Un método para cuantificar anticuerpos terapéuticos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.03.2021

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 2 815 224 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 terapéuticos

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de cuantificación de anticuerpos. De manera más precisa, se refiere a la cuantificación de anticuerpos terapéuticos en una muestra biológica.

Antecedentes de la invención

El análisis de muestras de plasma/suero generadas a partir de estudios *in vivo* de proteínas terapéuticas, especialmente de anticuerpos terapéuticos, es de interés en la industria biofarmacéutica.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son un grupo inminente de compuestos terapéuticos usados para tratar diversos tipos de enfermedades. Los anticuerpos monoclonales (mAb) constituyen una clase terapéutica que conoce la tasa actual más fuerte de desarrollo en el campo de la biotecnología farmacéutica. Hasta la fecha hay más de 50 mAb comercializados en diversos campos tales como oncología, inmunología, oftalmología y cardiología. Los anticuerpos monoclonales han proporcionado resultados médicos importantes en el tratamiento de varias enfermedades importantes incluyendo ensayos clínicos de enfermedades autoinmunitarias, cardiovasculares e infecciosas, cáncer e inflamación.

El tratamiento basado en anticuerpos para el cáncer ha llegado a establecerse durante los últimos 15 años y ahora es una de las estrategias más exitosas e importantes para tratar a pacientes con neoplasias hemáticas y tumores sólidos. El uso de anticuerpos monoclonales para el tratamiento contra el cáncer ha conseguido éxito considerable en los últimos años. De forma destacable, los conjugados de anticuerpo-fármaco son nuevas opciones de tratamiento potentes para linfomas y tumores sólidos, y los anticuerpos inmunomoduladores también han conseguido recientemente éxito clínico destacable. El desarrollo de anticuerpos terapéuticos requiere una profunda comprensión de la serología cancerosa, técnicas de manipulación de proteínas, mecanismos de acción y resistencia, y la interacción entre el sistema inmunitario y las células cancerosas.

Entre ellos, los anticuerpos anti-TNF que bloquean la acción de TNF alfa revolucionaron el tratamiento de enfermedades relacionadas con TNF tales como enfermedad inflamatoria del intestino, lupus, colitis ulcerosa, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y artritis reumatoide. Al neutralizar la actividad de TNF, los anticuerpos anti-TNF promueven la cicatrización de la mucosa e inducen remisiones a largo plazo en los pacientes. Los anticuerpos anti-TNF principales que está actualmente autorizados abarcan Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

Dada la naturaleza polipeptídica de los mAb 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 las concentraciones de anticuerpos monoclonales terapéuticos en plasma humano y muestras derivadas de suero humano es difícil. Para establecer las propiedades farmacocinéticas (PK) de los mAb en muestras humanas, se ejecutan muchos estudios clínicos. Las muestras de estos estudios muy a menudo se analizan usando inmunoensayos. Aunque los inmunoensayos son muy rápidos y sensibles, también hay algunas limitaciones.

La estrategia ELISA convencional se ha usado durante más de 25 años y tiene varias limitaciones. Los métodos ELISA requieren reactivos personalizados de alta calidad que pueden tardar varios meses en generarse y la optimización del ensayo puede tardar varios meses adicionales. Por tanto, ELISA tiene un tiempo de desarrollo de ensayo largo que es una limitación tanto en la fase de descubrimiento temprana como la fase de desarrollo de fármacos basados en proteína. Los reactivos de ELISA y condiciones de ensayo adecuados pueden no ser posibles en algunos casos debido a los requisitos de unión altamente personalizados para cada proteína terapéutica. Otra limitación de ELISA es que los reactivos pueden unirse no específicamente a proteínas del plasma/suero y la interferencia de la matriz es un fenómeno común. La cuantificación de proteínas por espectrometría de masas, por otro lado, es muy específica y, por lo tanto, la interferencia de la matriz es infrecuente en comparación con ELISA. Los métodos de espectrometría de masas de cuantificación de proteínas, CL-EM/EM en particular, no requieren reactivos personalizados y, en general, producen un desarrollo de ensayo más rápido. Además, la espectrometría de masas está menos sujeta a interferencias de la matriz y proporciona condiciones de ensayo genéricas que son muy específicas y pueden combinarse y automatizarse. La alta especificidad de la espectrometría de masas mide la concentración de analito usando las propiedades fisicoquímicas intrínsecas del analito, es decir, la masa y el patrón de fragmentación. El formato robusto permite la transferencia lista de un laboratorio a otro, una ventaja significativa para tratamientos de anticuerpo aprobados. Una metodología general para cuantificar las proteínas por espectrometría de masas es digestión con tripsina de la proteína intacta. Los péptidos resultantes se analizan por espectrometría de masas introduciendo los patrones internos marcados con isótopo estable correspondientes a una concentración fija.

Lebert *et al.* ("Absolute and multiplex quantification of antibodies in serum using PSAQ™ standards and LC-MS/MS"; Bioanalysis; 2015) se refiere a una cuantificación múltiple de anticuerpos en un suero de rata usando formas marcadas con isótopo de dichos anticuerpos como patrones.

5 Heudi *et al.* ("Towards Absolute Quantification of Therapeutic Monoclonal Antibody in Serum by LC-MS/MS Usando Isotope-Labeled Antibody Standard and Protein Cleavage Isotope Dilution Mass Spectrometry"; Anal. Chem.; 2008) se refiere a una cuantificación de solamente un anticuerpos terapéutico en un suero de primate («tití») usando solamente un anticuerpos marcado con isótopo como patrón interno.

10 Xu *et al.* ("A multiplexed hybrid LC-MS/MS pharmacokinetic assay to measure two co-administered monoclonal antibodies in a clinical study"; Bioanalysis; 2014) se refiere a una cuantificación de anticuerpos en un estudio clínico usando péptidos equivalentes.

15 La cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem es una herramienta potente para el análisis y cuantificación de proteínas en matrices muy complejas como muestras de plasma/suero. Como los péptidos resultantes de la digestión de la proteína de interés y otras proteínas de plasma/suero pueden tener la misma masa nominal o similar, la segunda dimensión de la fragmentación por EM a menudo proporciona un fragmento único de un péptido de interés.

20 Como puede comprenderse fácilmente, los métodos para controlar la concentración en suero de anticuerpos terapéuticos serán muy específicos, sensibles, precisos y reproducibles, para definir los ajustes de dosificación apropiados que deben ser beneficiosos para un paciente.

25 Los autores de la presente invención ahora han identificado que hay una necesidad en la técnica de métodos de cuantificación de anticuerpos terapéuticos que permitan una cuantificación precisa de estos anticuerpos en muestras recogidas de pacientes sometidos a tratamientos con anticuerpo, que sean métodos de cuantificación útiles independientemente del tipo de anticuerpo terapéutico que se haya administrado a esos pacientes y, además, no sean sensibles a la posible presencia de otros anticuerpos terapéuticos administrados previamente. De forma destacable, los autores de la presente invención han identificado que hay una necesidad de métodos simples todo en uno que permitan cuantificar anticuerpos terapéuticos en muestras de pacientes tratados, que sean métodos que no requieran que los facultativos médicos seleccionen un kit o método específico de acuerdo con el anticuerpo terapéutico específico que se espera que esté contenido en las muestras de los pacientes.

35 Sumario de la invención

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

a) añadir a una muestra de ensayo que puede contener anticuerpos terapéuticos una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos terapéuticos, por lo que se proporciona una muestra preproteólisis,

40 b) someter la muestra preproteólisis a una proteólisis enzimática, para proporcionar una muestra de proteólisis que comprende (i) péptidos marcados de proteólisis derivados de los anticuerpos terapéuticos marcados y (ii) péptidos de proteólisis derivados del anticuerpo terapéutico contenido en la muestra de ensayo,

c) determinar por análisis espectrométrico de masas la relación entre (i) uno o más péptidos marcados de proteólisis seleccionados y (ii) uno o más péptidos de proteólisis correspondientes derivados de dicho anticuerpo terapéutico,

45 d) calcular, a partir de la relación determinada en la etapa c), la cantidad de dicho anticuerpo terapéutico en la muestra de ensayo;

en el que la muestra de ensayo es una muestra de plasma humano o una muestra de suero humano, y los dos o más anticuerpos se seleccionan en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab, Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

50 En algunas realizaciones, los dos o más anticuerpos terapéuticos consisten en anticuerpos terapéuticos anti-TNF seleccionados en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

55 En algunas realizaciones, los dos o más anticuerpos terapéuticos consisten en anticuerpos terapéuticos antineoplásicos seleccionados en un grupo que consiste en: Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

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

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

60 b2) una etapa de proteólisis enzimática en condiciones no desnaturalizantes.

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

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

65 para Infliximab, péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 1 a 8**,

para Etanercept, péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 9 a 15**,

para Adalimumab, péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 16 a 23**,
 para Certolizumab, péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 24 a 30**, y
 para Golimumab, péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 31 a 37**,
 para Trastuzumab, péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 47-53**,
 para Rituximab, péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 54-64**, y
 para Bevacizumab, péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 65-72**.

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

De acuerdo con algunos otros aspectos de estas realizaciones del método, el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan en un grupo que comprende:

para Infliximab, péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 38 y 39**,
 para Etanercept, un péptido de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 40**,
 para Adalimumab, los péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 41 y 42**,
 para Certolizumab, los péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 43 y 44**, y
 para Golimumab, los péptidos de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 45 y 46**.

De acuerdo con algunas realizaciones del método, la etapa a) comprende las siguientes etapas:

a1) añadir a una muestra de ensayo que puede contener anticuerpos terapéuticos a cuantificar una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos terapéuticos, por lo que se proporciona una muestra preproteólisis no concentrada, y
 a2) enriquecer la muestra preproteólisis no concentrada en anticuerpos, por lo que se proporciona una muestra preproteólisis.

En algunas realizaciones de la etapa a1), dichos anticuerpos terapéuticos consisten en anticuerpos terapéuticos anti-TNF. De acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones, dichos anticuerpos anti-TNF se seleccionan en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

En algunas realizaciones preferidas del método, la muestra de ensayo es una muestra humana de un individuo al que se ha administrado un anticuerpo anti-TNF seleccionado en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

En algunas otras realizaciones de la etapa a1), dichos anticuerpos terapéuticos consisten en anticuerpos antineoplásicos. De acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones, dichos anticuerpos antineoplásicos se seleccionan en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

En algunas realizaciones preferidas del método, la muestra de ensayo es una muestra humana de un individuo al que se ha administrado un anticuerpo antineoplásico seleccionado en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

La presente invención también se refiere a un kit para cuantificar anticuerpos terapéuticos, que comprende dos o más anticuerpos terapéuticos marcados isotópicamente estables, seleccionados en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab, Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

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

De acuerdo con una realización particular, la invención se refiere a un kit para cuantificar anticuerpos terapéuticos, que comprende dos o más anticuerpos terapéuticos marcados isotópicamente estables, seleccionados en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab.

De acuerdo con una realización particular, la invención se refiere a un kit para cuantificar anticuerpos terapéuticos, que comprende dos o más anticuerpos terapéuticos marcados isotópicamente estables, seleccionados en un grupo que consiste en: Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

Descripción de las figuras

Figura 1: Curva valoración obtenida para Infliximab, medida en presencia de otros dos anticuerpos anti-TNF en una muestra de ensayo.

Ordenadas: Concentración medida de Infliximab expresada en $\mu\text{g/ml}$. Abscisas: concentración esperada de Infliximab expresada en $\mu\text{g/ml}$.

Figura 2: Evaluación de la concentración máxima de anticuerpos anti-TF que puede estar presente en una muestra de ensayo sin afectar a la captura de antígeno cuando se usa el método MSIA. Ordenadas: Concentración medida de Infliximab expresada en $\mu\text{g/ml}$. Abscisas: concentración esperada de Infliximab expresada en $\mu\text{g/ml}$.

Figura 3: Curva de valoración obtenida para Trastuzumab en suero humano, medida en presencia de dos anticuerpos terapéuticos distintos, concretamente Rituximab y Bevacizumab. Ordenadas: Concentración medida de Trastuzumab expresada en $\mu\text{g/ml}$. Abscisas: concentración esperada de Trastuzumab expresada en $\mu\text{g/ml}$.

5

Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona un método para cuantificar un anticuerpo terapéutico en muestras de individuos sanos que se tratan con anticuerpos terapéuticos, que es un método que permite una cuantificación precisa de estos anticuerpos terapéuticos, independientemente de la identidad del anticuerpo terapéutico que esté contenido en dicha muestra a ensayar.

La disponibilidad del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos que se describe en este documento proporciona ahora a los facultativos un solo método que puede usarse en general con muestras de cualquier individuo humano que recibe un tratamiento terapéutico con anticuerpos, sin tener en cuenta el tipo de anticuerpo terapéutico que se ha administrado a dicho individuo humano.

De forma destacable, en unidades de cuidados médicos donde algunos pacientes reciben un tratamiento con un primer anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, Infliximab) y donde algunos otros pacientes reciben un tratamiento con un segundo anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, Etanercept), el uso del método de cuantificación de anticuerpos descrito en este documento ya no requiere una selección de un método de cuantificación específico de anticuerpo anti-TNF como es el caso de acuerdo con la presente práctica habitual.

Además, en unidades de cuidados médicos especializadas, por ejemplo, en unidades de cuidados especializadas en cáncer, donde se realiza una pluralidad de tratamientos con anticuerpos antineoplásicos, dependiendo del tipo de cánceres que se tratan, el uso del método de cuantificación de anticuerpos descrito en este documento no requiere una selección de un método de cuantificación específico de anticuerpo antineoplásico, ni una selección de un protocolo de preparación de muestra específico de anticuerpo como es el caso de acuerdo con la práctica habitual.

Además, en situaciones en las que el tratamiento de un paciente se documenta erróneamente, por ejemplo, en situaciones en las que dicho paciente se considera que ha recibido un primer anticuerpo terapéutico (por ejemplo, (i) Infliximab o (ii) Trastuzumab) pero realmente ha recibido un segundo anticuerpo (por ejemplo, (i) Golimumab o (ii) Rituximab), el método de cuantificación de anticuerpos descrito en este documento, no obstante, permite (i) determinar el anticuerpo terapéutico (por ejemplo, (i) el anticuerpo anti-TNF específico usado o (ii) el antineoplásico específico usado) que el paciente realmente ha recibido y (ii) cuantificar el anticuerpo terapéutico que se ha administrado a dicho paciente, a pesar de la información errónea proporcionada al laboratorio de ensayo con respecto al anticuerpo terapéutico realmente usado.

Además, en situaciones en las que el paciente se somete a una politerapia que se administra con más de un anticuerpo terapéutico, la determinación de la cantidad en circulación global de anticuerpos terapéuticos, independientemente de la identidad y del número de anticuerpos terapéuticos que se usen, puede realizarse globalmente usando el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos que se describe en este documento.

Además, en situaciones en las que el paciente recibió un primer tratamiento basado en un primer anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un primer anticuerpo anti-TNF) y después un segundo tratamiento basado en un segundo anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-TNF), se deduce que durante un periodo de tiempo posterior a dicho cambio de tratamiento, ambos anticuerpos terapéuticos estarán presentes en los líquidos corporales del paciente, principalmente en el plasma del paciente. En estas situaciones, el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento permite la cuantificación de los anticuerpos terapéuticos al completo en dicho paciente y también permite la cuantificación de las cantidades respectivas (por ejemplo, concentración en plasma) de cada uno de los anticuerpos terapéuticos administrados.

La presente invención proporciona un método de cuantificación de uno o más anticuerpos terapéuticos en muestras de ensayo humanas, permitiendo dicho método la cuantificación de dichos anticuerpos terapéuticos, incluso cuando la naturaleza de los anticuerpos que se administraron a los pacientes ensayados no se conoce de forma precisa.

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

De forma ilustrativa, para cuantificar anticuerpos terapéuticos susceptibles a estar contenidos en muestras humanas originarias de unidades de cuidados médicos que alojan a pacientes tratados con anticuerpos anti-TNF y en las que se usa actualmente una pluralidad de anticuerpos terapéuticos anti-TNF para diversos tratamientos, entonces dos o más de las formas marcadas de dichos anticuerpos terapéuticos anti-TNF se añaden en la etapa a) del método de cuantificación. De forma ilustrativa, para cuantificar anticuerpos terapéuticos anti-TNF en muestras humanas originarias de unidades de cuidados médicos que hacen uso de 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, puede añadirse un número mayor de anticuerpos terapéuticos marcados, por ejemplo, un número mayor de anticuerpos terapéuticos anti-TNF marcados, en la etapa a) del método, por ejemplo, los cinco anticuerpos terapéuticos anti-TNF Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab. Dichas realizaciones del método de cuantificación posibilitan realizar la misma realización del método de cuantificación descrito en este documento, por ejemplo, con la adición de cinco anticuerpos terapéuticos anti-TNF, para cuantificar anticuerpos anti-TNF en muestras humanas proporcionadas por una pluralidad de unidades de cuidados médicos que hacen uso de distintos anticuerpos anti-TNF, tales como (i) una primera unidad de cuidados médicos que realiza tratamientos con Infliximab o Adalimumab, (ii) una segunda unidad de cuidados médicos que realiza tratamientos con Etanercept, Adalimumab o Golimumab y (iii) una tercera unidad de cuidados médicos que realiza tratamientos con Infliximab, Certolizumab y Golimumab. Como se ilustra, el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento puede realizarse dentro de las premisas de una unidad de plataforma de ensayo que centraliza el ensayo de muestras humanas originarias de una pluralidad de unidades de cuidados médicos.

De forma más ilustrativa, para cuantificar anticuerpos terapéuticos susceptibles a estar contenidos en muestras humanas originarias de unidades de cuidados médicos que alojan a pacientes tratados con anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa actualmente una pluralidad de anticuerpos antineoplásicos terapéuticos para diversos tratamientos, entonces dos o más de las formas marcadas de dichos anticuerpos antineoplásicos terapéuticos se añaden en la etapa a) del método de cuantificación. De forma ilustrativa, para cuantificar anticuerpos antineoplásicos terapéuticos en muestras humanas originarias de unidades de cuidados médicos que hacen uso de Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab, entonces las formas marcadas de Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab se añaden en la etapa a) del método de cuantificación. De hecho, puede añadirse un número mayor de anticuerpos terapéuticos marcados, por ejemplo, un número mayor de anticuerpos antineoplásicos terapéuticos marcados, en la etapa a) del método, por ejemplo, los tres anticuerpos antineoplásicos terapéuticos Trastuzumab, Rituximab and Bevacizumab.

De forma más ilustrativa, para cuantificar anticuerpos terapéuticos susceptibles a estar contenidos en muestras humanas originarias de unidades de cuidados médicos que alojan a pacientes tratados con anticuerpos anti-TNF y anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa actualmente una pluralidad de anticuerpos terapéuticos anti-TNF y anticuerpos antineoplásicos terapéuticos para diversos tratamientos (por ejemplo, para tratamientos contra el cáncer y artritis reumatoide, por ejemplo), entonces dos o más de las formas marcadas de dichos anticuerpos terapéuticos se añaden en la etapa a) del método de cuantificación. De forma ilustrativa, para cuantificar anticuerpos terapéuticos en muestras humanas originarias de unidades de cuidados médicos que hacen uso de Trastuzumab, Rituximab e Infliximab, entonces las formas marcadas de Trastuzumab, Rituximab e Infliximab se añaden en la etapa a) del método de cuantificación. De hecho, puede añadirse un número mayor de anticuerpos terapéuticos marcados, por ejemplo, un número mayor de anticuerpos terapéuticos anti-TNF y de anticuerpos antineoplásicos marcados, en la etapa a) del método, por ejemplo, los ocho anticuerpos terapéuticos Trastuzumab, Rituximab, Bevacizumab, Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

Por tanto, de acuerdo con el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, una muestra de ensayo "que puede contener anticuerpos terapéuticos" significa una muestra humana que se espera que comprenda al menos un anticuerpo terapéutico a cuantificar por una realización del método de cuantificación en el que dichos 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 ensayo que es sospechosa de contener 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 que se espera que estén contenidos en dicha muestra de ensayo.

Como se usa en este documento, la expresión "*comprende*" o "*que comprende*" abarca también "*consiste en*" o "*que consiste en*".

Como se usa en este documento, un "*anticuerpo terapéutico*" se refiere a un anticuerpo que es adecuado para su uso como medicamento, y que puede consistir en un anticuerpo completo o un fragmento del mismo; que incluye cualquier fragmento seleccionado de un grupo que comprende: anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos y anticuerpos quiméricos. La mayoría de 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)₂, scFv, Fc, pFc, cadena pesada y cadena ligera.

En algunas realizaciones específicas, esta invención se refiere a un método para cuantificar un anticuerpo terapéutico en una muestra de un individuo humano que ha recibido un tratamiento terapéutico con un anticuerpo terapéutico, incluyendo un anticuerpo terapéutico anti-TNF y/o antineoplásico, seleccionándose dichos anticuerpos terapéuticos de: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab, Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

De acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones, dichos dos o más anticuerpos terapéuticos anti-TNF se seleccionan en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

5 En algunas otras realizaciones específicas, se refiere a un método para cuantificar un anticuerpo terapéutico en una muestra de un individuo humano que ha recibido un tratamiento terapéutico con un anticuerpo terapéutico antineoplásico. De acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones, dichos dos o más anticuerpos terapéuticos antineoplásicos se seleccionan en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

10 El método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento puede realizarse para dos o más anticuerpos seleccionados en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab, Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

15 En algunas realizaciones, el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento puede realizarse para dos o más anticuerpos seleccionados en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

20 En algunas realizaciones, el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento puede realizarse para dos o más anticuerpos seleccionados en un grupo que consiste en: Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

Infliximab Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab son polipéptidos, cuyas secuencias respectivas se describen posteriormente en este documento.

Para Infliximab:

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVAVSGFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSK
 SINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGYYCSRNYYGSTYDY
 WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 25 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK (Heavy chain, SEQ ID NO. 73)

DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQFVGGSSIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESMSGI
 PSRFSGSGSGTDFLSINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (Light chain, SEQ
 ID NO. 74)

Para Adalimumab:

EVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWN
 SGHIDYADSVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLD
 YWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 30 QKSLSLSPGK (Heavy chain, SEQ ID NO. 75)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (Light chain,
SEQ ID NO. 76)

Para Etanercept:

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCD
CEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCPGWYCALSKQE
GCRLCAPLRKCRPGFVARPGTETSDVVCKPCAPGTFNNTSSTDICRPHQICNVV
AIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPM
GPSPPAEGSTGDEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
5 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 77)

Para Certolizumab:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINT
YIGEPIYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYRSYAMDY
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
KSCDKTHTCAA (Heavy chain, SEQ ID NO. 78)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASFLY
SGVPYRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (Light chain,
SEQ ID NO. 79)

10 *Para Golimumab:*

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYD
GSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRIAAGGNY
YYYGMDVISSQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (Heavy chain, SEQ ID NO. 80)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASOSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS

KDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (Light chain,
SEQ ID NO. 81)

Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab son polipéptidos, cuyas secuencias respectivas se describen posteriormente en este documento.

5

Para Trastuzumab:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD
YWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKLSLSPG (Heavy chain, SEQ ID NO. 82)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (Light chain,
SEQ ID NO. 83)

Para Rituximab:

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPG
NGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYF
NVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKLSLSPGK (Heavy chain, SEQ ID NO. 84)

10

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFFQKPGSSPKWIYATSNLASGV
PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (Light chain,
SEQ ID NO. 85)

Para Bevacizumab:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINT
YTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSH
WYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (Heavy chain, SEQ ID NO. 86)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSG
VPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (Light chain,
SEQ ID NO. 87).

5 Esta invención se refiere a dicho método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos, que hace uso de una técnica de cuantificación de CL-EM/EM.

10 En general, para realizar el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, dos o más anticuerpos terapéuticos de referencia (también denominados "compuestos de patrón interno" en este documento) se añaden a una muestra de ensayo, antes de someter la muestra resultante (también denominada "muestra preproteólisis" a proteólisis enzimática, para proporcionar una "muestra de proteólisis" que comprende (i) péptidos de proteólisis derivados de los anticuerpos terapéuticos de referencia y (ii) péptidos de proteólisis derivados del anticuerpo terapéutico contenido en la muestra de ensayo. En una etapa adicional del método, la cantidad de los anticuerpos terapéuticos que estaban contenidos inicialmente en la muestra de ensayo se determina mediante un método de espectrometría de masas, que incluye el cálculo de una relación entre (i) uno o más péptidos de proteólisis seleccionados derivados de los anticuerpos terapéuticos de referencia y (ii) uno o más péptidos de proteólisis correspondientes derivados de dichos anticuerpos terapéuticos susceptibles a estar contenidos inicialmente en la muestra de ensayo.

20 De hecho, para realizar el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, es esencial que (i) un péptido de proteólisis dado derivado de un anticuerpo terapéutico de referencia (compuesto de patrón interno) y (ii) el péptido de proteólisis correspondiente derivado del anticuerpo terapéutico inicialmente contenido en la muestra de ensayo se distingan por las señales de espectrometría respectivas que se generan por estos péptidos, para posibilitar el cálculo de una relación entre (i) dicho péptido de proteólisis derivado de dicho anticuerpo terapéutico de referencia y (ii) dicho péptido de proteólisis correspondiente derivado del anticuerpo terapéutico inicialmente contenido en la muestra de ensayo.

30 En realizaciones preferidas del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, estos péptidos de proteólisis pueden distinguirse por espectrometría de masas usando un compuesto de patrón interno que consiste en un anticuerpo terapéutico marcado, y muy preferiblemente un anticuerpo terapéutico marcado isotópicamente estable (SIL).

35 De hecho, el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento se diseña específicamente para cuantificar la cantidad (por ejemplo, la concentración) de anticuerpos terapéuticos contenidos en líquidos corporales de un paciente tratado con dichos anticuerpos terapéuticos, es decir, anticuerpos terapéuticos no marcados, de modo que los anticuerpos terapéuticos de referencia son muy preferiblemente anticuerpos terapéuticos marcados, y muy preferiblemente anticuerpos terapéuticos marcados isotópicamente estables (SIL), como se ilustra completamente a lo largo de toda la presente memoria descriptiva.

40 La presente invención se refiere a un método para cuantificar un anticuerpo terapéutico en una muestra de un individuo humano, que comprende las etapas de:

a) añadir a una muestra de ensayo que puede contener anticuerpos terapéuticos a cuantificar una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos terapéuticos, por lo que se proporciona una muestra preproteólisis,

b) someter la muestra preproteólisis a una proteólisis enzimática, para proporcionar una muestra de proteólisis que comprende (i) péptidos marcados de proteólisis derivados de los anticuerpos terapéuticos marcados y (ii) péptidos de proteólisis derivados del anticuerpo terapéutico contenido en la muestra de ensayo,

c) determinar por análisis espectrométrico de masas la relación entre (i) uno o más péptidos marcados de proteólisis seleccionados y (ii) uno o más péptidos de proteólisis correspondientes derivados de dicho anticuerpo terapéutico,

d) calcular, a partir de la relación determinada en la etapa c), la cantidad de dicho anticuerpo terapéutico en la muestra de ensayo;

en el que la muestra de ensayo es una muestra de plasma humano o una muestra de suero humano, y los dos o más anticuerpos se seleccionan en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab, Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

En algunas realizaciones de la etapa a), dichos anticuerpos terapéuticos consisten en anticuerpos terapéuticos anti-TNF. De acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones, dichos anticuerpos anti-TNF se seleccionan en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

En algunas realizaciones preferidas del método, la muestra de ensayo es una muestra humana de un individuo al que se ha administrado un anticuerpo anti-TNF seleccionado en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

En algunas otras realizaciones de la etapa a), dichos anticuerpos terapéuticos consisten en anticuerpos antineoplásicos. De acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones, dichos anticuerpos antineoplásicos se seleccionan en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

En algunas realizaciones preferidas del método, la muestra de ensayo es una muestra humana de un individuo al que se ha administrado un anticuerpo antineoplásico seleccionado en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

Los autores de la invención han demostrado que una cuantificación precisa de anticuerpos terapéuticos en una muestra humana, que también puede denominarse "muestra de ensayo" en este documento, puede permitirse a través del diseño de un método en el que la cantidad de anticuerpos terapéuticos, si están presentes en dicha muestra, se determina por un análisis de espectrometría de masas que hace uso de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos terapéuticos como patrones internos de un método de cuantificación de CL-EM/EM. Esto se ilustra de forma destacable en los ejemplos en este documento, mediante la cuantificación de anticuerpos anti-TNF y de anticuerpos antineoplásicos en muestras humanas, especialmente en muestras de suero humano.

Los autores de la invención han demostrado en este documento que el método que han concebido permite una cuantificación sensible, específica y reproducible de anticuerpos terapéuticos en muestras humanas, que abarcan muestras de plasma humano y muestras de suero humano. Estas ventajas del método de cuantificación descrito en este documento son muy destacables ya que la mayoría de los anticuerpos terapéuticos a cuantificar consisten en anticuerpos humanizados o anticuerpos "humanos completos" que comparten la mayoría de sus secuencias de aminoácidos con los anticuerpos que se encuentran de forma natural en los líquidos corporales humanos, incluyendo los anticuerpos que se encuentran en el suero humano o el plasma humano. Esta situación representaba una gran dificultad técnica para seleccionar péptidos derivados de anticuerpo específicos y únicos pertinentes a controlar por espectrometría, que no se encuentran de lo contrario de forma natural en líquidos corporales humanos, incluyendo suero humano o plasma humano.

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

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

Adalimumab es un anticuerpo monoclonal humano contra TNF-alfa, producido por tecnología de ADN recombinante usando un sistema de expresión en células de mamífero. Se encuentran pequeñas diferencias de aminoácidos en la región variable en comparación con secuencias de IgG humana.

Certolizumab pegol es un fragmento de anticuerpo Fab' recombinante contra el factor de necrosis tumoral alfa que está conjugado con un polietilenglicol de aproximadamente 40kDa. Se encuentran pequeñas diferencias de aminoácidos en la región variable del Fab' en comparación con secuencias de IgG humana.

Golimumab es un anticuerpo monoclonal IgG1k humano derivado de inmunización de ratones genomanipulados con TNF α humano. Se encuentran pequeñas diferencias de aminoácidos en la región variable en comparación con secuencias de IgG humana.

5 Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado del isotipo IgG1 dirigido contra el receptor humano HER2/Neu.

Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino-humano dirigido contra el receptor de CD20 y, por tanto, contiene secuencias de aminoácidos principalmente humanas que se encuentran en anticuerpos humanos. El anticuerpo es una inmunoglobulina IgG1 kappa que contiene secuencias de la región variable de la cadena ligera y pesada murinas y secuencias de la región constante humanas. Significa que la secuencias de aminoácidos encontradas en las regiones constantes son comunes a las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de IgG humana.

15 Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante del isotipo IgG1 dirigido contra VEGF humano.

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

Como se muestra en los ejemplos en este documento, los autores de la invención han demostrado que puede realizarse una cuantificación precisa de anticuerpos terapéuticos en una muestra humana a través del diseño de un método en el que la cantidad de anticuerpos terapéuticos, si están presentes en dicha muestra, se determina por un método de espectrometría de masas haciendo uso de (i) uno o más péptidos de proteólisis derivados de dos o más anticuerpos terapéuticos contenidos en dicha muestra humana y (ii) uno o más péptidos de proteólisis derivados de una forma marcada de dichos dos o más anticuerpos terapéuticos después de:

(A) calcular una relación entre:
 (i) la señal de espectrometría generada por uno o más péptidos de proteólisis derivados de anticuerpo terapéutico seleccionados de cada uno de dos o más anticuerpos terapéuticos

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

35 (B) determinar la cantidad de anticuerpos terapéuticos, si están presentes, en dicha muestra humana presentando el valor de la relación calculado en la etapa (A) para cada uno del uno o más péptidos de proteólisis en una curva de calibración de valores de relación.

El tipo del uno o más compuestos de patrón interno que se usan, concretamente anticuerpos terapéuticos marcados completos, contribuye fuertemente a la exactitud y precisión del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos que se describe en este documento como se explica en otra parte en la presente memoria descriptiva.

En algunas realizaciones, dichos anticuerpos terapéuticos consisten en anticuerpos anti-TNF, especialmente anticuerpos anti-TNF seleccionados en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

En algunas otras realizaciones, dichos anticuerpos terapéuticos consisten en anticuerpos antineoplásicos, especialmente anticuerpos antineoplásicos seleccionados en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

50 **Compuestos de patrón interno para cuantificar anticuerpos terapéuticos**

Como se muestra en los ejemplos en este documento, (1) la alta especificidad de los péptidos de proteólisis derivados de estos compuestos de patrón interno y de los anticuerpos terapéuticos contra proteínas plasmáticas humanas endógenas, así como (2) la alta homología fisicoquímica de (i) los péptidos de proteólisis derivados de estos compuestos de patrón interno, y de (ii) la proteólisis derivada de los anticuerpos terapéuticos, permite una cuantificación muy precisa de dichos anticuerpos terapéuticos en una muestra.

Para realizar el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, dos o más anticuerpos terapéuticos marcados distintos se añaden a la muestra de ensayo. Los péptidos de proteólisis marcados específicos (también denominados "péptidos equivalentes marcados") se generan en la etapa b), junto con los correspondientes péptidos de proteólisis no marcados (también denominados "péptidos equivalentes" o "péptidos equivalentes no marcados") de los correspondientes anticuerpos terapéuticos no marcados a cuantificar que estaban inicialmente presentes en dicha muestra de ensayo. Entonces, como se describe con mayor detalle en la presente memoria descriptiva, el uno o más anticuerpos terapéuticos presentes en la muestra de ensayo se cuantifican por un método de espectrometría de masas en el que las señales generadas por las parejas marcadas y no marcadas de

- 5 péptidos equivalentes se miden para determinar una relación entre las dos señales generadas (es decir, la señal generada por un péptido equivalente marcado específico y la señal generada por el péptido equivalente no marcado específico complementario). Entonces, los valores de relación se usan para determinar la concentración del uno o más anticuerpos terapéuticos inicialmente contenidos en la muestra de ensayo. Más preferiblemente, dichos valores de relación se usan para determinar la concentración del uno o más anticuerpos terapéuticos inicialmente contenidos en la muestra de ensayo presentando estos valores de relación en una curva de calibración de valores de relación. Por consiguiente, dichos "valores" consisten en las señales de espectrometría generadas por los péptidos de proteólisis controlados.
- 10 Entonces, el uno o más valores de relación se presentan en una curva de calibración para determinar la cantidad (por ejemplo, la concentración) de uno o más anticuerpos terapéuticos en la muestra de ensayo.
- 15 En algunas realizaciones, una curva de calibración representa (i) la cantidad medida de un anticuerpo terapéutico de interés (por ejemplo, en las ordenadas) frente a (ii) la cantidad esperada de dicho anticuerpo terapéutico (por ejemplo, en las abscisas).
- 20 En algunas otras realizaciones, una curva de calibración representa (i) los valores de relación entre el área de la señal de espectrometría de un anticuerpo terapéutico de interés y el área de la señal de espectrometría del correspondiente anticuerpo terapéutico marcado (compuestos de patrón interno) (por ejemplo, en las ordenadas) frente a (ii) la cantidad esperada de dicho anticuerpo terapéutico (por ejemplo, en las abscisas).
- 25 Cuanto mayor sea el número de anticuerpos terapéuticos marcados distintos añadidos en la muestra de ensayo en la etapa a) del método, mayor será el número de anticuerpos terapéuticos distintos que pueden cuantificarse en una muestra de ensayo usando el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en este documento.
- 30 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, estos uno o más anticuerpos terapéuticos marcados corresponden a (i) la una o más formas marcadas de uno o más anticuerpos terapéuticos que se han administrado a dicho individuo, y/o (ii) la una o más formas marcadas de uno o más anticuerpos terapéuticos que pueden estar presentes dentro de dicha muestra de ensayo.
- 35 En algunas realizaciones, estos anticuerpos terapéuticos marcados pueden consistir en uno o más anticuerpos terapéuticos que comprenden uno o más péptidos distintivos presentes dentro de los anticuerpos terapéuticos que (i) se han administrado a dicho individuo, y/o que (ii) pueden estar presentes dentro de dicha muestra de ensayo, y que deben cuantificarse.
- 40 En algunas realizaciones, estos anticuerpos terapéuticos y anticuerpos terapéuticos marcados pueden consistir en uno o más anticuerpos IgG humanizados, y fragmentos de los mismos.
- 45 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, el número de anticuerpos terapéuticos marcados que se usan como compuestos de patrón interno varían de dos a cinco anticuerpos marcados distintos, que abarca dos, tres, cuatro y cinco anticuerpos marcados distintos.
- 50 En algunas realizaciones, estos anticuerpos marcados pueden consistir en anticuerpos anti-TNF. De acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones, los anticuerpos anti-TNF pueden seleccionarse en un grupo que comprende Infliximab marcado, Etanercept marcado, Adalimumab marcado, Certolizumab marcado y Golimumab marcado.
- 55 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Infliximab marcado y Etanercept marcado.
- 60 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Infliximab marcado y Adalimumab marcado.
- 65 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Etanercept marcado y Adalimumab marcado.

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Infliximab marcado, Etanercept marcado, Adalimumab marcado y Golimumab marcado.

5 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Infliximab marcado, Adalimumab marcado, Certolizumab marcado y Golimumab marcado.

10 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Infliximab marcado, Etanercept marcado, Certolizumab marcado y Golimumab marcado.

15 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Etanercept marcado, Adalimumab marcado, Certolizumab marcado y Golimumab marcado.

20 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos anti-TNF marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Infliximab marcado, Etanercept marcado, Adalimumab marcado, Certolizumab marcado y Golimumab marcado.

En algunas realizaciones, estos anticuerpos marcados pueden consistir en anticuerpos antineoplásicos. De acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones, los anticuerpos antineoplásicos pueden seleccionarse en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

25 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos antineoplásicos marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Trastuzumab marcado y Rituximab marcado.

30 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos antineoplásicos marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Trastuzumab marcado y Bevacizumab marcado.

35 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos antineoplásicos marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Rituximab marcado y Bevacizumab marcado.

40 En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, los anticuerpos antineoplásicos marcados que se usan como compuestos de patrón interno comprenden Trastuzumab marcado, Rituximab marcado y Bevacizumab marcado.

45 Como se usa en este documento, un anticuerpo terapéutico "marcado", también denominado en este documento "forma marcada" de anticuerpos terapéuticos, consiste en un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo terapéutico o una combinación de anticuerpo a cuantificar, y que se ha obtenido por un método de acuerdo con el que uno o más aminoácidos marcados se han incorporado en la una o más cadenas polipeptídicas. Los métodos para marcar los anticuerpos terapéuticos (incluyendo anticuerpos anti-TNF y/o antineoplásicos) que se usan como compuestos de patrón interno en el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento se divulgan en otra parte en la presente memoria descriptiva.

50 Por tanto, como se usa en este documento, un anticuerpo anti-TNF "marcado" seleccionado en un grupo que comprende Infliximab marcado, Etanercept marcado, Adalimumab marcado, Certolizumab marcado y Golimumab marcado no significa que los anticuerpos terapéuticos Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab o Golimumab se hayan marcado. En su lugar, un anticuerpo anti-TNF "marcado" consiste en un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo terapéutico anti-TNF seleccionado en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab y que se ha obtenido por un método de acuerdo con el que uno o más aminoácidos marcados se han introducido en la una o más cadenas polipeptídicas. Los métodos para marcar los anticuerpos anti-TNF que se usan como compuestos de patrón interno en el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento se divulgan en otra parte en la presente memoria descriptiva.

60 Además, un anticuerpo antineoplásico "marcado" seleccionado en un grupo que comprende Trastuzumab marcado, Rituximab marcado y Bevacizumab marcado no significa que los anticuerpos terapéuticos Trastuzumab, Rituximab o Bevacizumab se hayan marcado. En su lugar, un anticuerpo antineoplásico "marcado" consiste en un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo terapéutico antineoplásico seleccionado en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab y que se ha obtenido por un método de acuerdo con el que uno o más aminoácidos marcados se han introducido en la una o más cadenas polipeptídicas. Los métodos para marcar los anticuerpos antineoplásicos que se usan como compuestos de patrón interno en el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento se divulgan en otra parte en la presente memoria descriptiva.

65

Como se usa en este documento, un anticuerpo terapéutico "marcado", también denominado en este documento "forma marcada" de anticuerpos terapéuticos, consiste en un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo terapéutico o una combinación de anticuerpo a cuantificar, y que se ha obtenido por un método de acuerdo con el que uno o más aminoácidos marcados se han incorporado en la una o más cadenas polipeptídicas. Los métodos para marcar los anticuerpos terapéuticos (incluyendo anticuerpos anti-TNF y/o antineoplásicos) que se usan como compuestos de patrón interno en el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento se divulgan en otra parte en la presente memoria descriptiva.

Por tanto, como se usa en este documento, un anticuerpo anti-TNF "marcado" seleccionado en un grupo que comprende Infliximab marcado, Etanercept marcado, Adalimumab marcado, Certolizumab marcado y Golimumab marcado no significa que los anticuerpos terapéuticos Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab o Golimumab se hayan marcado. En su lugar, un anticuerpo anti-TNF "marcado" consiste en un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo terapéutico anti-TNF seleccionado en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab y que se ha obtenido por un método de acuerdo con el que uno o más aminoácidos marcados se han introducido en la una o más cadenas polipeptídicas. Los métodos para marcar los anticuerpos anti-TNF que se usan como compuestos de patrón interno en el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento se divulgan en otra parte en la presente memoria descriptiva.

Además, un anticuerpo antineoplásico "marcado" seleccionado en un grupo que comprende Trastuzumab marcado, Rituximab marcado y Bevacizumab marcado no significa que los anticuerpos terapéuticos Trastuzumab, Rituximab o Bevacizumab se hayan marcado. En su lugar, un anticuerpo antineoplásico "marcado" consiste en un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo terapéutico antineoplásico seleccionado en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab y que se ha obtenido por un método de acuerdo con el que uno o más aminoácidos marcados se han introducido en la una o más cadenas polipeptídicas. Los métodos para marcar los anticuerpos antineoplásicos que se usan como compuestos de patrón interno en el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento se divulgan en otra parte en la presente memoria descriptiva.

Selección de péptidos de proteólisis derivado de un anticuerpo terapéutico

Los péptidos de proteólisis derivados de un anticuerpo terapéutico a controlar por espectrometría de masas cuando se realiza el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento pueden seleccionarse de acuerdo con métodos de selección que son conocidos por los expertos en la materia.

De acuerdo con el presente método de cuantificación de anticuerpos que se realiza partiendo con una muestra humana, y especialmente una muestra de plasma humano o una muestra de plasma humano, los péptidos de proteólisis se seleccionarán para (i) que sean discriminantes con respecto a péptidos de proteólisis susceptibles a generarse sometiendo proteínas endógenas humanas a la acción de una proteasa, por ejemplo, tripsina o IdeS, y (ii) que sean discriminantes con respecto a péptidos de proteólisis susceptibles a generarse por la acción de una proteasa, por ejemplo, tripsina o IdeS, sobre otros anticuerpos terapéuticos exógenos que son susceptibles de estar presentes en dicha muestra humana, por ejemplo, dicha muestra de plasma humano o dicha muestra de suero humano.

La estrategia de péptidos equivalentes se basa en el análisis del péptido equivalente para la cuantificación de la proteína diana completa. Por lo tanto, la selección del péptido equivalente apropiado es crucial para garantizar la sensibilidad, especificidad y robustez del ensayo. Habitualmente, los péptidos "distintivos", que son péptidos únicos para la proteína diana específica, se eligen como péptidos equivalentes. La selección de los péptidos equivalentes apropiados debe: (1) evitar péptidos propensos a modificación química (por ejemplo, péptidos que contienen metionina, cisteína o triptófano); (2) evitar arginina-arginina y lisina-lisina en la secuencia peptídica para minimizar la digestión trípica incompatible; y (3) seleccionar péptidos con longitud apropiada (~ 8-20 aminoácidos): que sean demasiado cortos puede provocar ausencia de selectividad, y demasiado largos puede afectar a la sensibilidad (Wu *et al.*, Rapid Commun Mass Spectrom. 2011; Vol. 25:281-90).

Un procedimiento típico es realizar una digestión *in silico* del anticuerpo terapéutico dado para generar un conjunto de posibles péptidos equivalentes. Estos péptidos entonces se investigan frente a todas las proteínas existentes en las matrices biológicas usando bases de datos en línea (por ejemplo, Standard Protein BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) para confirmar que los péptidos distintivos existen solamente en la proteína diana. La sensibilidad, especificidad y comportamiento cromatográfico de estos péptidos distintivos se evalúan entonces usando muestras de proteínas digeridas reales en matrices biológicas, y el o los mejores se elegirán como el o los péptidos equivalentes para dicho anticuerpo terapéutico dado.

Los péptidos de proteólisis se seleccionan basándose en herramientas de predicción *in silico* en línea (Kamiie *et al.*, Pharmaceutical Research, vol. 25(6): 1469-1483, 2008). Todos los posibles péptidos tríplicos se cribaron por alineación frente al proteoma humano.

Como se usa en este documento, los péptidos de proteólisis, que también pueden denominarse péptidos equivalentes en este documento, se seleccionan basándose en su singularidad entre los péptidos que pueden estar presentes

después de someter plasma humano o suero humano a una proteasa. Por consiguiente, cada péptido de proteólisis seleccionado consiste en una características distintiva única de la presencia de un anticuerpo terapéutico dado en una muestra.

5 Para un anticuerpo terapéutico dado a cuantificar con el método de cuantificación descrito en este documento, la selección de uno o más péptidos de proteólisis (es decir, "uno o más péptidos equivalentes") puede realizarse comparando (i) un conjunto de los péptidos de proteólisis esperados derivados de dicho anticuerpo terapéutico dado con (ii) un conjunto de los péptidos de proteólisis que se esperan obtener de la misma proteólisis de proteínas de plasma humano o suero humano, y especialmente un conjunto de los péptidos de proteólisis que se esperan obtener de la misma proteólisis de anticuerpos terapéuticos.

10 En algunas realizaciones, el conjunto de péptidos de proteólisis esperados puede obtenerse *in silico* usando la masa del péptido de consulta en la herramienta bioinformática en línea www.expasy.ch después de introducir en la herramienta (i) la secuencia de dicho anticuerpo terapéutico dado y (ii) las secuencias de las proteínas que se espera que estén contenidas en plasma humano o suero humano, y especialmente las secuencias de anticuerpos terapéuticos, tales como IgG humana. Entonces, se seleccionan los péptidos encontrados exclusivamente en el conjunto de péptidos de proteólisis derivados de dicho anticuerpo terapéutico dado y que, por tanto, no se encuentran en el conjunto de péptidos de proteólisis derivados de las proteínas que se espera que estén contenidas en plasma humano o suero humano, tales como IgG humana.

15 La selección de péptidos de proteólisis (péptidos equivalentes) derivados de dicho anticuerpo terapéutico dado también puede realizarse *in silico*, realizando una búsqueda de similitud mediante alineación de secuencias frente a una base de datos de proteínas humanas tales como la base de datos UniProtKB_HUMAN, y usando un programa bioinformático pertinente, por ejemplo, la herramienta bioinformática denominada BLAST 2.0 (*Basic Local Alignment Search Tool*). La selección del uno o más péptidos de proteólisis derivados de dicho anticuerpo terapéutico dado para cuantificación por CL-EM/EM en general tendrá en cuenta la puntuación resultante de BLAST que calcula la significación estadística de las coincidencias.

20 Entre el conjunto de uno o más péptidos proteolíticos posibles preseleccionados como se describe anteriormente, se excluyen aquellos péptidos proteolíticos posibles con sitios de escisión perdidos por la proteasa. Los sitios de escisión perdidos pueden predecirse usando el programa informático denominado MC:pred (Lawless *et al.*, OMICS, Sep 2012, Vol. 16(9)).

25 Entonces, en algunas realizaciones, la singularidad de cada uno de los péptidos de proteólisis seleccionados se confirma muy preferiblemente de manera experimental, por ejemplo, frente a un subconjunto de la base de datos UniProt SwissProt de *Homo sapiens* incrementada por la secuencia de dicho anticuerpo terapéutico dado.

30 En otras realizaciones más, la singularidad de cada uno de los péptidos de proteólisis seleccionados se confirma muy preferiblemente de manera experimental además analizando una muestra que contiene una colección de solución terapéutica polivalente humana (es decir, IgG) de la misma manera para garantizar que los péptidos distintivos de dicho anticuerpo terapéutico dado están ausentes de la digestión con proteasa polivalente humana (es decir, IgG).

Realizaciones específicas de péptidos de proteólisis seleccionados

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

para Infliximab:

40 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),
DILLTQSPAILSVSPGER (SEQ ID NO. 6),
55 ASQFVGSSIHWHYQQR (SEQ ID NO. 7),
YASEMSGIPSR (SEQ ID NO.8),

para Etanercept:

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

para Adalimumab:

65 GLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGR (SEQ ID NO. 16),

VSYLSTASSLDYWGGQGLVTVSSASTK (SEQ ID NO.17),
 QAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVGR (SEQ ID NO.18),
 ASQGIR (SEQ ID NO. 19),
 5 NYLAWYQQKPGK (SEQ ID NO. 20),
 LLIYAASLTQSGVPSR (SEQ ID NO. 21),
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQR (SEQ ID NO.22),
 APYTFGQGTK (SEQ ID NO. 23),
para Certolizumab:
 10 LSCAASGYVFTDYGMNWVR (SEQ ID NO. 24),
 GLEWMGWINTYIGAPIYADSVK (SEQ ID NO.25),
 FTFSLDTSK (SEQ ID NO. 26),
 STAYLQMNSLR (SEQ ID NO. 27),
 ASQNVGTNVAWYQQKPGK (SEQ ID NO. 28),
 ALIYSASFLYSGVPYR (SEQ ID NO. 29)
 15 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTK (SEQ ID NO. 30),
para Golimumab:
 LSCAASGFIFSSYAMHWVR (SEQ ID NO. 31),
 QAPNGLEWVAFMSYDGSNK (SEQ ID NO. 32),
 20 GIAAGGNYYYYGMDVISSQGTTVTVSSASTK (SEQ ID NO. 33),
 ASQSVYSYLAWYQQK (SEQ ID NO. 34),
 LLIYDASNR (SEQ ID NO. 35),
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQR (SEQ ID NO. 36),
 SNWPPFTFGPGTK (SEQ NO. 37),
para Trastuzumab:
 25 LSCAASGFNIK (SEQ ID NO. 47)
 DTYIHWVR (SEQ ID NO. 48)
 IYPTNGYTR (SEQ ID NO. 49)
 FTISADTSK (SEQ ID NO. 50)
 ASQDVNTAVAWYQQKPGK (SEQ ID NO. 51)
 30 LLIYSASFLYSGVPSR (SEQ ID NO. 52)
 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK (SEQ ID NO. 53)
para Rituximab:
 QVQLQQPGAELVKPGASVK (SEQ ID NO. 54)
 ASGYTFTSYNMHWVK (SEQ ID NO. 55)
 35 GLEWIGAIYPGNGDTSYNQK (SEQ ID NO. 56)
 ATLTADK (SEQ ID NO. 57)
 SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR (SEQ ID NO.58)
 STYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSAASTK (SEQ ID NO.59)
 QIVLSQSPAILSASPGEK (SEQ ID NO. 60)
 40 VTMTCR (SEQ ID NO. 61)
 ASSSVSYIHWYFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPVR (SEQ ID NO. 62)
 FSGSGSGTSYSLTISR (SEQ ID NO.63)
 VEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTK (SEQ ID NO. 64)
para Bevacizumab:
 45 LSCAASGYTFTNYGMNWVR (SEQ ID NO. 65)
 GLEWVGWINTYTGEPTYAADFK (SEQ ID NO. 66)
 FTFSLDTSK (SEQ ID NO. 67)
 STAYLQMNSLR (SEQ ID NO. 68)
 YPHYYGSSHWYFDVWGQGLVTVSSASTK (SEQ ID NO. 69)
 50 VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK (SEQ ID NO. 70)
 VLIYFTSSLHSGVPSR (SEQ ID NO. 71)
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTK (SEQ ID NO. 72)

55 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 dirigida a la bisagra, el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan en un grupo que comprende:

para Infliximab:
 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRS
 KSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVIYCSRNYYGST
 YDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPPELLG [VH + CHI] (SEQ ID NO. 38),

y

DILLTQSPAILSVSPIGERVVSFSCRASQFVGGSSIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESMS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[VL + CL] (SEQ ID NO. 39),

para Etanercept:

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTV
DSCEDSTYTQLWNVWPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTRPGWYCAL
SKQEGCRLCAPLRKCRPGFVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNNTSSTDICRPH
QICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAP
STSFLPMGPPPAEGSTGDEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG *[Fraction P75 du*
récepteur soluble du TNF alpha] (SEQ ID NO. 40),

para Adalimumab:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIT
WNSGHIDYADSVGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTA
SSLDYWGQGLTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG *[VH + CHI]* (SEQ ID NO. 41),

5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLT
QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[VL + CL] (SEQ ID NO.42)

para Certolizumab:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMINWVRQAPGKGLEWMGWI
NTYIGEPYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYRSYA
MDYWGQGLTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCAA *[VH + CHI]* (SEQ ID NO. 43),

10

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALISASFL
YSGVPYRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[VL + CL] (SEQ ID NO. 44),

para Golimumab:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMS
YDGSNKKYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRIAA
GGNYYYYGMDVISSQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG *[VH + CHI]* (SEQ ID NO. 45),

15

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
 ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDESTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[VL + CL] (SEQ ID NO. 46)

5 La selección mencionada anteriormente de péptidos de proteólisis consiste en 73 péptidos distintos, que pueden considerarse individualmente y como una combinación de dos o más péptidos de proteólisis seleccionados, para realizar métodos de cuantificación de anticuerpos de la invención.

10 Por consiguiente, cuando la selección mencionada anteriormente de anticuerpos terapéuticos marcados, y péptidos sometidos de proteólisis de los mismos, se considera como una combinación de dos o más péptidos, dicha combinación puede incluir:
 uno o más péptidos sometidos a proteólisis derivados de un mismo anticuerpo; y/o
 uno o más péptidos sometidos a proteólisis derivados de una pluralidad de anticuerpos.

15 Por consiguiente, los anticuerpos terapéuticos que se usan como compuestos de patrón interno, pueden ser adecuados para generar dos o más péptidos de proteólisis seleccionados, que comprenden o que consisten en las SEQ ID NO. 1 a 72, incluyendo cualquier combinación de las mismas.

20 Por consiguiente, los dos o más péptidos de proteólisis seleccionados que se consideran explícitamente por la invención, incluyen cualquier combinación de dos péptidos de proteólisis seleccionados que comprenden o que consisten en las SEQ ID NO. 1 a 72, y que se marcan a continuación en este documento (**tabla 1**) por un signo "X":

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	(...)	72
1'		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2'	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3'	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4'	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5'	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6'	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7'	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8'	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9'	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10'	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
12'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
13'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
14'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
15'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
16'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X

ES 2 815 224 T3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	(...)	72
17'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
18'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
19'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
20'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
21'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
22'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
23'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
24'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
25'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
26'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
27'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
28'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
29'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
30'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
31'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
32'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
33'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
34'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
35'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
36'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
37'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
38'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
39'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
40'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
41'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
42'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
43'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
44'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
45'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
46'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

ES 2 815 224 T3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	(...)	72	
47'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
48'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
49'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
50'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
51'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
52'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
53'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
54'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
55'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
56'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
57'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
58'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
59'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
60'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
61'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
62'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
63'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
64'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
65'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
66'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
67'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
68'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
69'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
70'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
71'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
72'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

en la que " " en el eje de ordenadas marca uno o más péptidos de proteólisis seleccionados que incluyen al menos un péptido de proteólisis seleccionado correspondiente a la SEQ ID NO. de 1 a 72;

5 en la que (...) corresponde a cualquier SEQ ID NO. Y, siendo Y un número entero seleccionado de 18 a 71, que incluye 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 y 71;

en la que "X" marca una combinación de los dos péptidos de proteólisis seleccionados, seleccionados de las correspondientes SEQ ID seleccionadas de las SEQ ID 1 a 72.

10 Por consiguiente, cualquier combinación de las mismas se divulga expresamente en el sentido de la invención: cuando Z péptidos de proteólisis seleccionados se controlan (es decir, como péptidos marcados con isótopo estables), estos pueden seleccionarse, de una manera iterativa, de una cualquiera de las combinaciones de dos que se describen anteriormente. Por consiguiente, una mezcla que comprende (Z-1) péptidos de proteólisis seleccionados, incluyendo al menos un péptido de proteólisis seleccionado de la SEQ ID como se define en el eje de ordenadas se combina entonces con un péptido de proteólisis seleccionado adicional como se define en el eje de abscisas, proporcionando de ese modo los Z péptidos de proteólisis seleccionados a controlar.

15 Por consiguiente, los Z (dos o más) péptidos de proteólisis seleccionados pueden abarcar más de dos, que incluyen más dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez y más de diez péptidos de proteólisis seleccionados.

20

Los anticuerpos terapéuticos que se usan como compuestos de patrón interno se marcan con uno o más isótopos estables. Los isótopos estables pueden seleccionarse en un grupo que comprende ^2H , ^{13}C , ^{15}N y ^{18}O . Preferiblemente, los isótopos estables se seleccionan en un grupo que comprende ^{13}C y ^{15}N .

5 En algunas realizaciones, el marcaje isotópico se restringe únicamente a aminoácidos específicas, que son preferiblemente arginina, lisina y/o leucina.

10 Un péptido marcado con isótopo estable (SIL) generado por proteólisis de un anticuerpo terapéutico marcado (anticuerpo terapéutico SIL) usado como compuesto de patrón interno, debido a un incremento de masa suficiente con respecto al mismo péptido, pero sin marcar (es decir, un péptido sin marcar generado por proteólisis del correspondiente anticuerpo terapéutico sin marcar inicialmente presente en la muestra de ensayo), se discrimina, por tanto, de dicho péptido de proteólisis sin marcar por análisis de espectrometría de masas.

15 De forma ilustrativa, un péptido marcado con isótopo estable seleccionado en un grupo que comprende los péptidos equivalentes de la SEQ ID NO 1-8 (para Infliximab), la SEQ ID NO. 9-15 (para Etanercept), la SEQ ID NO. 16-23 (para Adalimumab), la SEQ ID NO. 24-30 (para Certolizumab), la SEQ ID NO. 31-37 (para Golimumab), la SEQ ID NO. 47-53 (para Trastuzumab), la SEQ ID NO. 54-64 (para Rituximab) o la SEQ ID NO. 65-72 (para Bevacizumab) se discrimina por análisis de espectrometría de masas, a partir de los péptidos equivalentes no marcados de las mismas secuencias de aminoácidos respectivas que se generan tras tratamiento con tripsina de Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab, Trastuzumab, Rituximab o Bevacizumab, respectivamente.

25 Además, un péptido marcado con isótopo estable seleccionado en un grupo que comprende los péptidos equivalentes de la 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 por análisis de espectrometría de masas, a partir de los péptidos equivalentes no marcados de las mismas secuencias de aminoácidos respectivas que se generan tras tratamiento con IdeS de Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab o Golimumab, respectivamente.

30 Los anticuerpos anti-TNF marcados con isótopo estables (SIL) están, de manera destacable, disponibles en el mercado.

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™.

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

Generación de una curva de calibración

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

50 Como se detallará adicionalmente en la presente memoria descriptiva, la cuantificación de anticuerpos terapéuticos se realiza presentando el valor de relación calculado para cada péptido de proteólisis considerado en la muestra humana ensayada, o muestra de ensayo, en una curva de calibración de valores de relación generados, para cada anticuerpo terapéutico de interés, con cantidades conocidas de dicho anticuerpo terapéutico de interés y cantidades fijas y conocidas de una forma marcada de dicho anticuerpo terapéutico que se usa como compuesto de patrón interno.

55 Para generar una curva de calibración, se prepara una serie o conjunto de muestras de calibración (CS), en el que: cada muestra de calibración contiene una cantidad conocida del anticuerpo terapéutico seleccionado, muy preferiblemente una cantidad conocida de un anticuerpo anti-TNF seleccionado en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab o muy preferiblemente una cantidad conocida de un anticuerpo antineoplásico seleccionado en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab, cada muestra de calibración contiene una cantidad fija y conocida de una forma marcada de dicho anticuerpo terapéutico usado como compuesto de patrón interno, muy preferiblemente una cantidad fija y conocida de una forma marcada de dicho anticuerpo terapéutico seleccionado usado como compuesto de patrón interno seleccionado en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab, o muy preferiblemente una cantidad fija y conocida de una forma marcada de dicho anticuerpo terapéutico seleccionado usado como compuesto de patrón interno seleccionado en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab, y

la serie o conjunto de muestras de calibración se prepara para que cubra un intervalo de cantidades de los anticuerpos terapéuticos que abarca al menos el intervalo de cantidades del o de los anticuerpos terapéuticos que se espera que estén contenidos en una muestra de ensayo.

- 5 Por motivos de claridad, cada muestra de calibración comprende la misma cantidad fija y conocida del compuesto de patrón interno seleccionado.

De forma ilustrativa, el intervalo de cantidades del anticuerpo terapéutico seleccionado que está cubierto por la serie o conjunto de muestras de calibración, cuando se expresa como una concentración final en las muestras de calibración, puede variar de 0,1 µg/ml a 100 µg/ml. Por ejemplo, una serie o conjunto de muestras de calibración puede comprender ocho muestras de calibración que comprenden un anticuerpo terapéutico de interés a las concentraciones finales respectivas 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.

15 Por tanto, de acuerdo con el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, puede generarse una curva de calibración por cada anticuerpo terapéutico de interés. En algunas realizaciones, puede generarse una curva de calibración por cada anticuerpo anti-TNF de interés, especialmente por cada anticuerpo anti-TNF de interés seleccionado en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab. En algunas realizaciones, puede generarse una curva de calibración por cada anticuerpo antineoplásico de interés, especialmente por cada anticuerpo antineoplásico de interés seleccionado en un grupo que comprende 20 Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

En otras realizaciones, puede generarse una curva de calibración simultáneamente para una pluralidad de anticuerpos terapéuticos, especialmente para una pluralidad de anticuerpos anti-TNF seleccionados en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab, o especialmente para una pluralidad de anticuerpos antineoplásicos seleccionados en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab. De acuerdo con estas realizaciones, una serie de muestras de calibración, conteniendo cada muestra de calibración (i) una pluralidad de anticuerpos terapéuticos no marcados, especialmente para una pluralidad de anticuerpos anti-TNF seleccionados en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab, o especialmente para una pluralidad de anticuerpos antineoplásicos seleccionados en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab, estando cada anticuerpo terapéutico a una concentración dada, y (ii) la forma marcada correspondiente (muy preferiblemente anticuerpos SIL) de cada uno de dicho anticuerpo terapéutico a una concentración fija, y en la que la serie de muestras de calibración cubre un intervalo de concentraciones (por ejemplo, de 0,1 µg/ml a 100 µg/ml) de dichos anticuerpos terapéuticos no marcados, y en la que está presente la misma concentración fija de los correspondientes anticuerpos terapéuticos marcados en cada muestra de calibración (por ejemplo, una concentración fija de 20 µg/ml de cada anticuerpo terapéutico marcado).

De forma ilustrativa, la cantidad dada del anticuerpo terapéutico marcado seleccionado usado como compuesto de patrón interno, especialmente la cantidad dada de anticuerpo anti-TNF marcado seleccionado en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab, o especialmente la cantidad dada de anticuerpo antineoplásico seleccionado en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab, 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 terapéutico correspondiente para limitar la diferencia en la intensidad de la señal de espectrometría de masas generada por las cantidades respectivas (i) de péptidos equivalentes marcados derivados de proteólisis enzimática de dicho anticuerpo terapéutico marcado usado como compuesto de patrón interno y (ii) de los correspondientes péptidos de proteólisis derivados de dicho anticuerpo terapéutico. De forma ilustrativa, las relaciones de cantidad (por ejemplo, que se expresa como cantidad en peso o como cantidades en peso/volumen) entre un anticuerpo terapéutico no marcado y el correspondiente anticuerpo terapéutico marcado puede variar de 1:10 a 10:1, que abarca relaciones de cantidad de 1:5 a 5:1.

50 De hecho, la cantidad de anticuerpos terapéuticos que pueden encontrarse en una muestra de ensayo, especialmente en una muestra de ensayo que consiste en una muestra de suero humano originaria de un paciente tratado por anticuerpos terapéuticos, puede variar, dependiendo de (i) la cantidad de anticuerpo o anticuerpos terapéuticos que se ha administrado a dicho paciente, (ii) el periodo de tiempo en que 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 administración de anticuerpos terapéuticos, y (iv) parámetros fisiológicos que pueden ser específicos para dicho paciente, tal como la tasa de eliminación de dichos anticuerpos de la sangre.

En algunas realizaciones, la serie o conjunto de muestras de calibración puede comprender además una o más muestras de calibración de control que no contienen el anticuerpo terapéutico seleccionado o, como alternativa, que no contienen ningún anticuerpo terapéutico.

Más preferiblemente, una muestra de calibración se prepara partiendo de una muestra de líquido corporal inicialmente exenta del anticuerpo terapéutico seleccionado o del compuesto de patrón interno seleccionado, y preferiblemente suero o plasma de un mamífero no humano o de un individuo humano, y muy preferiblemente suero humano o plasma humano.

Entonces, cada muestra de calibración se somete a las mismas etapas del método que las descritas para las muestras de ensayo en otra parte en la presente memoria descriptiva, para proporcionar una serie o conjunto de muestras de ensayo de calibración (CAS).

5 Entonces, cada muestra de ensayo de calibración se somete a análisis espectrométrico, y muy preferiblemente a un análisis de CL-EM/EM, en las mismas condiciones que las descritas para las muestras de ensayo en otra parte en la presente memoria descriptiva y entonces se miden los valores de las señales de espectrometría generadas por (i) un péptido equivalente seleccionado generado por proteólisis enzimática del anticuerpo terapéutico seleccionado y por
10 (ii) el correspondiente péptido marcado seleccionado (también denominado "péptido equivalente marcado") generado por proteólisis enzimática del anticuerpo terapéutico marcado seleccionado, especialmente por el correspondiente péptido seleccionado (también denominado "péptido equivalente marcado") generado por proteólisis enzimática del anticuerpo terapéutico marcado seleccionado, incluyendo un anticuerpo anti-TNF marcado seleccionado en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab o incluyendo un anticuerpo antineoplásico seleccionado en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab, usando como
15 compuesto de patrón interno.

Entonces, para cada muestra de ensayo de calibración (CAS), se calcula una relación de (i) el valor de señal de espectrometría generado por el péptido equivalente de anticuerpo terapéutico seleccionado a (ii) el valor de señal de espectrometría generado por el péptido equivalente marcado derivado de patrón interno seleccionado.

20 Como se detallará adicionalmente en la presente memoria descriptiva, un valor de señal espectrométrica puede consistir en el área del pico de SRM (control de reacción seleccionada - Selected Reaction Monitoring) específico, o de manera más precisa, en la media de las áreas de pico de SRM específico, generadas por un péptido seleccionado de interés, típicamente por un péptido tríptico equivalente seleccionado derivado del anticuerpo terapéutico marcado
25 seleccionado usado como un patrón interno descrito en este documento.

Por tanto, se proporciona una serie o un conjunto de valores de relación, calculándose cada valor de relación 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 terapéutico seleccionado y una cantidad fija y conocida del compuesto de patrón interno.

Entonces puede generarse una curva de calibración representando la serie o conjunto de valores de referencia calculados frente a las correspondientes cantidades teóricas del anticuerpo terapéutico seleccionado, por ejemplo, frente a las correspondientes concentraciones finales conocidas del anticuerpo terapéutico seleccionado.

35 Como se usa en este documento, una concentración "final" de un anticuerpo terapéutico seleccionado es la concentración de dicho anticuerpo terapéutico en una muestra de calibración (CS) inicial, comprendiendo dicha CS una cantidad añadida conocida de dicho anticuerpo terapéutico.

40 **Preparación de muestra**

En algunas realizaciones, la muestra que se usa en el método de cuantificación se origina a partir de una muestra de sangre humana completa que se ha recogido previamente de un individuo. En realizaciones preferidas, los glóbulos, y especialmente los eritrocitos, se retiran por centrifugación para obtener una muestra de plasma. En otras
45 realizaciones preferidas, se permite que se produzca coagulación de la muestra de sangre completa y se obtiene una muestra de suero.

Al menos para determinar el perfil farmacocinético de anticuerpos terapéuticos 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 de tampón, antes de usarla como muestra de ensayo en el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de acuerdo con la invención.

55 Sin embargo, en las realizaciones más 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 tal cual sin diluir.

Como se describirá adicionalmente en la presente memoria descriptiva, de acuerdo con el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, la muestra a ensayar se añade con una cantidad conocida de los dos o más anticuerpos terapéuticos marcados seleccionados usados como compuestos de patrón interno en la etapa a).

65 En estas realizaciones, por tanto, se proporciona una muestra que contiene una cantidad conocida de cada uno de los dos o más anticuerpos terapéuticos marcados seleccionados usados como compuestos de patrón interno y una cantidad desconocida de anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, anticuerpos anti-TNF o anticuerpos antineoplásicos).

En algunas realizaciones, dicha muestra comprende solamente dos compuestos de patrón interno, que se seleccionan entre anticuerpos anti-TNF de interés, y muy preferiblemente solamente dos compuestos de patrón interno, que se seleccionan en un grupo que comprende Infliximab marcado, Etanercept marcado, Adalimumab marcado, Certolizumab marcado y Golimumab marcado.

En otras realizaciones, dicha muestra comprende más de dos compuestos de patrón interno, que se seleccionan entre anticuerpos anti-TNF de interés y muy preferiblemente más de dos compuestos de patrón interno, que se seleccionan en 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 de patrón interno, que se seleccionan entre anticuerpos anti-TNF de interés y muy preferiblemente 3, 4 o 5 compuestos de patrón interno, que se seleccionan en un grupo que comprende Infliximab marcado, Etanercept marcado, Adalimumab marcado, Certolizumab marcado y Golimumab marcado. Las diversas combinaciones de compuestos de patrón interno que se añaden (o "incorporan") se describen en otra parte en la presente memoria descriptiva.

En algunas realizaciones, dicha muestra comprende solamente dos compuestos de patrón interno, que se seleccionan entre anticuerpos antineoplásicos de interés, y muy preferiblemente solamente dos compuestos de patrón interno, que se seleccionan en un grupo que comprende Trastuzumab marcado, Rituximab marcado y Bevacizumab marcado.

En otras realizaciones, dicha muestra comprende más de dos compuestos de patrón interno, que se seleccionan entre anticuerpos antineoplásicos de interés y muy preferiblemente más de dos compuestos de patrón interno, que se seleccionan en un grupo que comprende Trastuzumab marcado, Rituximab marcado y Bevacizumab marcado. Estas otras realizaciones abarcan aquellas en las que dicha muestra comprende 3 compuestos de patrón interno, que se seleccionan entre anticuerpos antineoplásicos de interés.

Las diversas combinaciones de compuestos de patrón interno que se añaden (o "incorporan") se describen en otra parte en la presente memoria descriptiva.

Los compuestos de patrón interno se someten a cada una de las etapas adicionales del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento.

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, la etapa a) comprende las siguientes etapas:

- a1) añadir a una muestra de ensayo que puede contener anticuerpos terapéuticos una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos terapéuticos, tal como una cantidad conocida de dos o más anticuerpos anti-TNF marcados que se seleccionan en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab o tal como una cantidad conocida de anticuerpos antineoplásicos marcados que pueden seleccionarse en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab, por lo que se proporciona una muestra preproteólisis no concentrada, y
- a2) enriquecer la muestra preproteólisis no concentrada en anticuerpos, por lo que se proporciona una muestra preproteólisis.

Preparación de mezcla preproteólisis

En la etapa a), o como alternativa en la etapa a2), por tanto, se proporciona una mezcla preproteólisis que contiene una cantidad conocida de compuestos de patrón interno y una cantidad desconocida de anticuerpos terapéuticos.

En realizaciones muy preferidas, dicha mezcla preproteólisis comprende dos o más anticuerpos terapéuticos marcados.

En algunas realizaciones muy preferidas, dicha mezcla preproteólisis comprende dos o más anticuerpos anti-TNF marcados, especialmente dos o más anticuerpos anti-TNF marcados seleccionados en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab, como compuestos de patrón interno.

En algunas otras realizaciones muy preferidas, dicha mezcla preproteólisis comprende dos o más anticuerpos antineoplásicos marcados, especialmente dos o más anticuerpos antineoplásicos seleccionados en un grupo que comprende Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

Enriquecimiento de la muestra en anticuerpos terapéuticos

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, la etapa a) o, como alternativa, la etapa a2), puede consistir en una etapa en la que el enriquecimiento en anticuerpos terapéuticos se realiza por inmunocaptura, es decir, formado complejos de los anticuerpos terapéuticos posiblemente presentes en la muestra de ensayo con los correspondientes ligandos de anticuerpos terapéuticos, y en el que los complejos reversibles formados entre los anticuerpos terapéuticos y dichos ligandos de anticuerpos terapéuticos pueden purificarse y los anticuerpos anti-TNF pueden disociarse y recogerse.

Estas realizaciones de la etapa a), o etapa a2), del método de cuantificación pueden realizarse por 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 terapéuticos usando un sustrato en el que se inmovilizan los ligandos de anticuerpos terapéuticos, preferiblemente un sustrato en el que se inmovilizan las correspondientes moléculas diana.

Por tanto, de acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones de la etapa a) o, como alternativa, la etapa a2), del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos, la inmunocaptura puede realizarse usando un sustrato en que se inmovilizan moléculas diana (por ejemplo, moléculas de TNF alfa humano, moléculas de Her2/Neu humano, moléculas de VEGF humano o moléculas de CD20 humano).

Además, de acuerdo con algunos otros aspectos de estas realizaciones de la etapa a) o, como alternativa, la etapa a2), del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos, la inmunocaptura puede realizarse usando un sustrato en que se inmovilizan moléculas de unión a Fc (por ejemplo, moléculas de proteína A o moléculas de proteína G).

Enriquecimiento de la muestra en anticuerpos terapéuticos por inmunocaptura

Esta realización se ilustra a continuación en este documento, cuando el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento se usa para cuantificar anticuerpos anti-TNF. De hecho, un experto en la materia puede aplicar la misma técnica para cuantificar anticuerpos terapéuticos dirigidos contra otras dianas de interés.

En algunas realizaciones ilustradas en los ejemplos en este documento, la muestra de ensayo se enriquece en anticuerpos anti-TNF usando un método de inmunocaptura. De acuerdo con estas realizaciones, el enriquecimiento en anticuerpos anti-TNF por reducción de proteínas que no son de anticuerpo se realiza usando un soporte de cromatografía de afinidad en que se inmovilizan moléculas de TNF alfa. De manera más precisa, de acuerdo con este método, se inmoviliza TNF alfa biotinilado en un soporte y el soporte resultante se pone en contacto con la muestra de ensayo añadida previamente para capturar las moléculas de unión a TNF que están presentes en la muestra de ensayo añadida, 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 posiblemente están presentes en la muestra de ensayo antes de añadir los anticuerpos anti-TNF SIL.

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

En algunas realizaciones preferidas, se hace uso de un método de inmunoensayo por espectrometría de masas inversa (MSIA - Reverse Mass Spectrometry Immuno-Assay) tal como el que se denomina 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 microesferas recubiertas con estreptavidina comercializadas con el nombre de Dynabeads™, tales como Dynabeads™ M-280 Streptavidin comercializadas por la empresa InVitrogen (Cergy-Pontoise, Francia).

Enriquecimiento en anticuerpos terapéuticos por reducción de proteína que no es de anticuerpo

En algunas realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, la etapa a) o, como alternativa, la etapa a2), puede consistir en una etapa en la que el enriquecimiento en anticuerpos terapéuticos se realiza por reducción de una parte sustancial de las proteínas, excepto las proteínas de anticuerpo, que están inicialmente contenidas en la muestra de ensayo.

Sin embargo, el enriquecimiento general en anticuerpos terapéuticos (tales como anticuerpos IgG) usando un método de precipitación de proteínas plasmáticas, tiene varios inconvenientes. Dicho método para la precipitación general de proteínas plasmáticas, aunque es simple, rápido, barato y permite acceso a la medición de la fracción de proteínas totales, la mezcla enriquecida con proteínas plasmáticas resultante no está suficientemente enriquecida en anticuerpos terapéuticos, lo que es perjudicial para la reproducibilidad de la posterior etapa de proteólisis con tripsina, y finalmente es perjudicial para la precisión del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos (es decir, anti-TNF y/o antineoplásicos). Por consiguiente, aunque dicho método de precipitación puede usarse para realizar el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento, dicha realización de preparación de muestra no es el más preferido.

De acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones, la reducción de proteínas que no son de anticuerpo puede realizarse usando resinas específicas que tienen afinidad por proteínas que son conocidas en la técnica, tales como la resina Cibacron-blue, que incluye la agarosa Cibacron-blue™ 3 GA comercializada de manera destacable por la empresa Sigma-Aldrich (MI, EE. UU.).

De acuerdo con algunos aspectos de estas realizaciones, la reducción de proteínas que no son de anticuerpo puede realizarse por precipitación de una parte sustancial de las proteínas inicialmente contenidas en la muestra de ensayo, excepto las proteínas de anticuerpo.

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

Diversos métodos para enriquecer una muestra en anticuerpos terapéuticos son conocidos en la técnica.

10 En algunas realizaciones, el enriquecimiento en anticuerpos terapéuticos puede realizarse por precipitación con sulfato de amonio, usando métodos bien conocidos en la técnica, para obtener una composición enriquecida en anticuerpos, tal como una composición enriquecida en IgG.

15 De acuerdo con aspectos adicionales de estas realizaciones, la reducción de proteínas que no son de anticuerpo puede realizarse por precipitación de las proteínas de anticuerpo inicialmente contenidas en la muestra de ensayo, tal como realizando precipitación de anticuerpos con sulfato de amonio, por ejemplo, usando una solución saturada de sulfato de amonio (30 % v/v).

Cromatografía con proteína A

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

25 En algunas realizaciones, el enriquecimiento en anticuerpos terapéuticos puede realizarse por cromatografía de afinidad, que incluye el uso de sustratos de cromatografía en que se han inmovilizado ligandos pertinentes tales como proteína A, proteína G o, como alternativa, anticuerpos que se unen a la parte Fc de anticuerpos terapéuticos, así como aptámeros de ácido nucleico o peptídicos que se unen a la parte Fc de anticuerpos terapéuticos.

30 La etapa de enriquecimiento en anticuerpos terapéuticos 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 y antineoplásicos.

35 Preferiblemente en este documento, se prefiere el enriquecimiento en anticuerpos terapéuticos usando cromatografía con proteína A o proteína G.

En particular, el enriquecimiento en IgG sometiendo la muestra a cromatografía con proteína A o proteína G permite la reducción de casi la totalidad de proteínas plasmáticas mientras retiene la totalidad de anticuerpos IgG inicialmente contenidos en la misma, que incluye la totalidad de anticuerpos anti-TNF y antineoplásicos inicialmente contenidos en la misma.

40 Más preferiblemente, el enriquecimiento en anticuerpos IgG se realiza por cromatografía con proteína A.

45 En las realizaciones en las que se usa cromatografía con proteína A, se realiza de manera convencional la elución de los anticuerpos terapéuticos retenidos, en particular, anticuerpos IgG, a un pH ácido, en general 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 terapéuticos puede recogerse por elución usando una solución de ácido fórmico (0,5 %-1 % v/v) a un pH que varía de 1 a 3. Después de la evaporación del ácido fórmico, la muestra seca puede resuspenderse en un medio líquido que contiene bicarbonato de amonio a un pH que varía de 7 a 8, para procesamiento adicional.

50 En estas realizaciones, por tanto, se proporciona una composición enriquecida en anticuerpos, en particular, una composición enriquecida en IgG, que contiene una cantidad conocida de los compuestos de patrón interno y una cantidad desconocida de anticuerpos anti-TNF y/o antineoplásicos.

Concentración de la composición enriquecida en anticuerpos (es decir, enriquecida en IgG)

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

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

65 En realizaciones preferidas, la etapa de concentración es una etapa de ultrafiltración en la que se usa una membrana de filtro de un valor límite pertinente.

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

5 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 posteriores del método que se realizan. De forma destacable, el intercambio de tampón que puede realizarse durante la etapa de ultrafiltración permite obtener una composición enriquecida en IgG concentrada en que la etapa posterior de proteólisis mediante tripsina se conseguirá de forma óptima.

10 **Etapa de proteólisis**

Esta etapa es la etapa b) del método general de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento.

15 Como se describe adicionalmente en este documento, la etapa de proteólisis consiste en someter la mezcla preproteólisis, que contiene los anticuerpos terapéuticos marcados (usados como compuestos de patrón interno) y posiblemente los anticuerpos terapéuticos no marcados a cuantificar, a una proteólisis enzimática para generar, de forma destacable, péptidos de proteólisis derivados de anticuerpos terapéuticos, concretamente (i) péptidos de proteólisis derivados de anticuerpos terapéuticos marcados generados a partir de dos o más compuestos de patrón interno añadidos a la etapa a) y péptidos de proteólisis derivados de anticuerpos terapéuticos no marcados generados a partir de los anticuerpos terapéuticos no marcados a cuantificar, si estos anticuerpos terapéuticos no marcados están presentes inicialmente en la muestra de ensayo.

20 Puede realizarse una pluralidad de realizaciones de una etapa de proteólisis. En particular, las enzimas de proteólisis, que también pueden denominarse proteasas en este documento, pueden seleccionarse en un inmenso grupo de proteasas bien conocidas en la técnica. Como el sitio o sitios de escisión de cada proteasa conocida es parte del conocimiento técnico de los expertos en la materia, la selección de una proteasa específica en la etapa b) se correlaciona con el posterior control de los péptidos de proteólisis de anticuerpos terapéuticos resultantes esperados generados a partir de los mismos, por análisis espectrométrico de masas.

25 En algunas realizaciones de la etapa de proteólisis que se ilustran en los ejemplos en este documento, la proteasa seleccionada tiene actividad de tripsina.

30 En algunas otras realizaciones de la etapa de proteólisis que se ilustran en los ejemplos en este documento, la proteasa seleccionada tiene actividad dirigida a la bisagra.

35 **Proteólisis con tripsina de una etapa**

40 De acuerdo con estas realizaciones de la etapa de proteólisis, se añade tripsina a la mezcla preproteólisis, para generar (i) péptidos trípticos a partir del anticuerpo terapéutico inicialmente contenido en la muestra de ensayo y (ii) péptidos trípticos generados por proteólisis con tripsina de los anticuerpos terapéuticos marcados usados como compuestos de patrón interno. Los péptidos trípticos específicos derivados del anticuerpo monoclonal de patrón interno también pueden denominarse "péptidos equivalentes" en este documento.

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

50 En algunas otras realizaciones que se ilustran en los ejemplos en este documento, la proteólisis con tripsina de una etapa se realiza usando una combinación de tripsina y endoproteinasa Lys-C (también denominada "EndolysC" en este documento) como "proteasa". De acuerdo con estas realizaciones, la combinación o mezcla de tripsina y endoproteinasa Lys-C contiene ventajosamente una relación de cantidad en peso de tripsina a EndolysC que varía de 0,1:1 a 20:1, que abarca una relación de cantidad en peso de 0,5:1 a 15:1, preferiblemente una relación de cantidad en peso que varía de 1:10:1. Como se conoce bien en la técnica, la tripsina escinde cadenas peptídicas principalmente en el lado carboxílico de los aminoácidos lisina y arginina, excepto cuando está seguido de prolina.

55 Como también se conoce bien en la técnica, la EndolysC escinde cadenas peptídicas en el lado carboxílico del aminoácido lisina.

60 La etapa de proteólisis se realiza preferiblemente en condiciones que son óptimas para:
(i) generar todos los péptidos trípticos equivalentes esperados, y
(ii) evitar la autólisis de tripsina.

Puede usarse una tripsina purificada que tiene una baja capacidad de autólisis. De forma ilustrativa, puede usarse una tripsina denominada Trypsin Gold® que se comercializa por la empresa Promega (Madison, WI, Estados Unidos).

65 Las condiciones óptimas de proteólisis pueden alcanzarse usando una relación molar de tripsina/proteína total que varía de 1/100 a 1/1.

En realizaciones muy preferidas, la etapa de proteólisis se realiza en condiciones no desnaturizantes, es decir, en condiciones que no provocan desnaturización de las proteínas. De forma destacable, la etapa de proteólisis se realiza en ausencia de un agente de desnaturización de proteínas tal como urea o clorhidrato de guanidinio.

5 La proteólisis en presencia de tripsina se realiza durante un periodo de tiempo que puede adaptarlo de forma óptima un experto en la materia.

10 De forma ventajosa, la proteólisis se realiza a 37 °C durante un periodo de tiempo que varía de 0,5 horas a 15 horas, preferiblemente de 1 hora a 10 horas, y muy preferiblemente que varía de 2 horas a 4 horas. En algunas realizaciones, la proteólisis se realiza a 37 °C durante una noche.

15 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.

20 En realizaciones muy preferidas, la etapa de proteólisis de una etapa se realiza en condiciones no desnaturizantes, es decir, en condiciones en las que no hay desnaturización de las proteínas inicialmente contenidas en la muestra preproteólisis.

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

25 **Proteólisis con tripsina de dos etapas**

En algunas realizaciones, la etapa b) puede realizarse mediante una proteólisis con 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 desnaturizantes y la etapa b2) de proteólisis enzimática en condiciones no desnaturizante, como se ilustra en los ejemplos en este documento.

30 La una o más enzimas que se usan en las etapas b1) y b2) pueden ser iguales a las divulgadas para realizar la "proteólisis con tripsina de una etapa" especificada anteriormente.

35 En algunas realizaciones, la una o más enzimas que se usan en la etapa b1) son las mismas que la o las que se usan en la etapa b2). En algunas otras realizaciones, la una o más enzimas que se usan en la etapa b1) son distintas de la o las que se usan en la etapa b2).

40 De acuerdo con el método de proteólisis de dos etapas, la etapa b1) consiste en una etapa de predigestión en la que el objetivo es aumentar la sensibilidad de las proteínas contenidas en la muestra preproteólisis, y principalmente la sensibilidad a tripsina de los anticuerpos (incluyendo los anticuerpos terapéuticos) contenidos en la muestra preproteólisis.

45 La etapa b1) se realiza en condiciones desnaturizantes, tal como en presencia de urea, ventajosamente a una concentración final que varía de 4 M a 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 como se describe de la realización de "proteólisis con tripsina de una etapa" anterior.

50 En algunas otras realizaciones, la etapa b1) se realiza usando EndolysC como única proteasa. De acuerdo con estas otras realizaciones, EndolysC está presente en la muestra resultante a una concentración final que varía de 0,01 µg/ml a 10 µg/ml.

55 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.

60 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.

65 En algunas realizaciones, la etapa b2) se realiza usando una mezcla de proteasas de EndolysC y tripsina en una cantidad como se describe de la realización de "proteólisis con 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 adición de proteasa o mezcla de proteasas adicional en la etapa b2) ya que dicha proteasa o mezcla de proteasas ya está presente a la concentración final apropiada en la muestra predigestión obtenida al final de la etapa b1). De acuerdo con estas realizaciones, la etapa b1) puede realizarse en condiciones en las que EndolysC es activa y tripsina es inactiva, y en las que la tripsina se vuelve activa en la etapa b2) haciendo cambios en las condiciones fisicoquímicas de la muestra tal como añadiendo una composición de tampón apropiada al inicio de la etapa b2). De forma ilustrativa, puede añadirse solución de tampón de bicarbonato de amonio a una concentración final apropiada al inicio 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 inicio de la etapa b2), de modo que la muestra usada al inicio de la etapa b2) comprende una mezcla de proteasas de EndolysC y tripsina, a la relación y concentración final deseadas.

En algunas otras realizaciones, la etapa b1) se realiza usando tripsina como única proteasa añadida. De acuerdo con estas otras realizaciones, preferiblemente no hay adición adicional de tripsina en la etapa b2).

De forma ventajosa, la proteólisis en la etapa b2) se realiza a 37 °C durante un periodo de tiempo que varía de 0,5 horas a 15 horas, preferiblemente de 1 hora a 10 horas, y muy preferiblemente que varía de 2 horas a 4 horas. En algunas realizaciones, la proteólisis se realiza a 37 °C durante una 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.

Proteólisis con una proteasa dirigida a la bisagra

En algunas realizaciones de la etapa b), la proteólisis se realiza usando una proteasa dirigida a la bisagra. Las proteasas dirigidas a la bisagra son proteasas conocidas que logran una escisión en una proteína de anticuerpo en la región de bisagra para generar (i) dos regiones Fc de las cadenas pesadas y (ii) un resto F(ab')₂, respectivamente. Los restos Fab entonces pueden obtenerse a partir del resto F(ab')₂, por métodos bien conocidos por los expertos en la materia, tal como usando un agente reductor tal como ditioneitol (DTT).

En la etapa b), la proteasa dirigida a la bisagra se selecciona preferiblemente en 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), catepsina G (Reichert *et al.*, 2010, Mabs, Vol. 2: 84-100), pseudolisina (Strohl *et al.*, 2009, Curr Opin Biotechnol, Vol. 20: 685-691), mirabilisina, glutamil 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 degradante de inmunoglobulina de *Streptococcus* (ideS) (Tamerius *et al.*, 1976, J Immunol, Vol. 116: 724-730; Reichert *et al.*, 2010, Mabs, Vol. 2: 84-100).

Más preferiblemente, estas realizaciones de la etapa b) se realizan usando enzima degradante de inmunoglobulina de *Streptococcus* (ideS) como proteasa dirigida a la bisagra. En estas realizaciones, puede usarse ideS que se inmoviliza en 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, Misuri, Estados Unidos).

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

La mezcla de proteólisis resultante puede recogerse por centrifugación y/o precipitación de proteínas, antes de la suspensión, como se ilustra en los ejemplos en este documento.

Cuantificación de anticuerpos terapéuticos por análisis espectrométrico de masas

Esta etapa abarca las etapas c) y d) del método general de cuantificación de anticuerpos terapéuticos descrito en este documento.

La etapa c) se realiza por espectrometría de masas, de acuerdo con técnicas de cuantificación de proteínas por espectrometría de masas que son conocidas en la técnica.

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

5 Preferiblemente, se usa un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) equipado con una fuente de IEN que funciona en modo de iones positivos y que usa el modo de control de reacción de múltiple (MRM) para la cuantificación.

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

10 Entonces, en algunas realizaciones, el estado más abundante de carga de (i) péptidos proteolíticos equivalentes seleccionados derivados de los anticuerpos terapéuticos marcados usados como compuestos de patrón interno y de (ii) los péptidos proteolíticos derivados de los anticuerpos terapéuticos inicialmente presentes en la muestra de ensayo se observan preferiblemente entre 200 m/z y 2000 m/z en la fuente de ionización IEN y se seleccionan y fragmentan.

15 En la etapa de cuantificación por espectrometría de masas, se investigaron las transiciones de control de reacción seleccionada (SRM) específicas de

(i) el uno o más péptidos proteolíticos equivalentes seleccionados de un anticuerpo terapéutico y de
(ii) el correspondiente péptido proteolítico marcado derivado del correspondiente anticuerpo terapéutico marcado usado como uno de los compuestos de patrón interno.

20 Como ya se menciona en otra parte en la presente memoria descriptiva, 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 única proteasa o como proteasa contenida en una mezcla de proteasas, el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan en un grupo que comprende:

25 *para Infliximab*: péptidos de la SEQ ID NO. 1-8,
para Etanercept: péptidos de la SEQ ID NO. 9-15,
para Adalimumab: péptidos de la SEQ ID NO. 16-23,
para Certolizumab: péptidos de la SEQ ID NO. 24-30, y
para Golimumab: péptidos de la SEQ ID NO. 31-37.
30 *para Trastuzumab*: péptidos de la SEQ ID NO. 47-53.
para Rituximab: péptidos de la SEQ ID NO. 54-64.
para Bevacizumab: péptidos de la SEQ ID NO. 65-72.

35 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Infliximab como compuesto de patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de forma destacable de acuerdo con el número de péptidos de proteólisis disponibles. El número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de 1 a 8 péptidos de proteólisis, dependiendo del número de péptidos de proteólisis que están disponibles, que abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 péptidos de proteólisis seleccionados.

45 En las realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos en el que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en el que se usa un homólogo marcado de Infliximab como compuesto de patrón interno y en el que se controlan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

50 En las realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos en el que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en el que se usa un homólogo marcado de Infliximab como compuesto de patrón interno y en el que se controlan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

65

5 En las realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos en el que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en el que se usa un homólogo marcado de Infliximab como compuesto de patrón interno y en el que se controlan cuatro péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 1, 2, 3 y 4; SEQ ID NO. 1, 2, 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.

15 En las realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos en el que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en el que se usa un homólogo marcado de Infliximab como compuesto de patrón interno y en el que se controlan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

25 En las realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos en el que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en el que se usa un homólogo marcado de Infliximab como compuesto de patrón interno y en el que se controlan seis péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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;

30 En las realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos en el que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en el que se usa un homólogo marcado de Infliximab como compuesto de patrón interno y en el que se controlan siete péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

35 En las realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos en el que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en el que se usa un homólogo marcado de Infliximab como compuesto de patrón interno y en el que se controlan ocho péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

40 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Etanercept como compuesto de patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de 1 a 7, que abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 péptidos de proteólisis seleccionados.

45 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Etanercept como compuesto de patrón interno, en las que se controlan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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; SEQ ID NO. 14 y 15.

55 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Etanercept como compuesto de patrón interno, en las que se controlan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

65 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Etanercept como compuesto de patrón interno, en las que se controlan cuatro péptidos de proteólisis seleccionados,

5 estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

10 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Etanercept como compuesto de patrón interno, en las que se controlan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

15 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Etanercept como compuesto de patrón interno, en las que se controlan seis péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

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

25 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina y en las que se usa un homólogo marcado de Adalimumab como compuesto de patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de 1 a 8, que abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 péptidos de proteólisis seleccionados.

30 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Adalimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 16 y 17; SEQ ID NO. 16 y 18; SEQ ID NO. 16 y 19; SEQ ID NO. 16 y 20; SEQ ID NO. 16 y 21; SEQ ID NO. 16 y 22; SEQ ID NO. 16 y 23; SEQ ID NO. 17 y 18; SEQ ID NO. 17 y 19; SEQ ID NO. 17 y 20; SEQ ID NO. 17 y 21; SEQ ID NO. 17 y 22; SEQ ID NO. 17 y 23; SEQ ID NO. 18 y 19; SEQ ID NO. 18 y 20; SEQ ID NO. 18 y 21; SEQ ID NO. 18 y 22; SEQ ID NO. 18 y 23; SEQ ID NO. 19 y 20; SEQ ID NO. 19 y 21; SEQ ID NO. 19 y 22; SEQ ID NO. 19 y 23; SEQ ID NO. 20 y 21; SEQ ID NO. 20 y 22; SEQ ID NO. 20 y 23; SEQ ID NO. 21 y 22; y SEQ ID NO. 22 y 23.

35 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Adalimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 16, 17 y 18; SEQ ID NO. 16, 17 y 19; SEQ ID NO. 16, 17 y 20; SEQ ID NO. 16, 17 y 21; SEQ ID NO. 16, 17 y 22; SEQ ID NO. 16, 17 y 23; SEQ ID NO. 16, 18 y 19; SEQ ID NO. 16, 18 y 20; SEQ ID NO. 16, 18 y 21; SEQ ID NO. 16, 18 y 22; SEQ ID NO. 16, 18 y 23; SEQ ID NO. 16, 19 y 20; SEQ ID NO. 16, 19 y 21; SEQ ID NO. 16, 19 y 22; SEQ ID NO. 16, 19 y 23; SEQ ID NO. 16, 20 y 21; SEQ ID NO. 16, 20 y 22; SEQ ID NO. 16, 20 y 23; SEQ ID NO. 16, 21 y 22; SEQ ID NO. 16, 21 y 23; SEQ ID NO. 16, 22 y 23; SEQ ID NO. 17, 18 y 19; SEQ ID NO. 17, 18 y 20; SEQ ID NO. 17, 18 y 21; SEQ ID NO. 17, 18 y 22; SEQ ID NO. 17, 18 y 23; SEQ ID NO. 17, 19 y 20; SEQ ID NO. 17, 19 y 21; SEQ ID NO. 17, 19 y 22; SEQ ID NO. 17, 19 y 23; SEQ ID NO. 17, 20 y 21; SEQ ID NO. 17, 20 y 22; SEQ ID NO. 17, 20 y 23; SEQ ID NO. 17, 21 y 22; SEQ ID NO. 17, 21 y 23; SEQ ID NO. 17, 22 y 23; SEQ ID NO. 18, 19, y 20; SEQ ID NO. 18, 19 y 21; SEQ ID NO. 18, 19 y 22; SEQ ID NO. 18, 19 y 23; SEQ ID NO. 18, 20 y 21, SEQ ID NO. 18, 20 y 22; SEQ ID NO. 18, 20 y 23; SEQ ID NO. 18, 21 y 22; SEQ ID NO. 18, 21 y 23, SEQ ID NO. 18, 22 y 23; SEQ ID NO. 19, 20 y 21; SEQ ID NO. 19, 20 y 22; SEQ ID NO. 19, 20 y 23; SEQ ID NO. 19, 21 y 22; SEQ ID NO. 19, 21 y 23; SEQ ID NO. 19, 22 y 23; SEQ ID NO. 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 20, 22 y 23; SEQ ID NO. 21, 22 y 23.

40 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Adalimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan cuatro péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 16, 17, 18 y 19; SEQ ID NO. 16, 17 18 y 20; SEQ ID NO. 16, 17, 18, y 21; SEQ ID NO. 16, 17, 18 y 22; SEQ ID NO. 16, 17, 18 y 23; SEQ ID NO. 16, 18, 19 y 20; SEQ ID NO. 16, 18, 19 y 21; SEQ ID NO. 16, 18, 19 y 22; SEQ ID NO. 16, 18, 19 y 23; SEQ ID NO. 16, 19, 20 y 21; SEQ ID NO. 16, 19, 20 y 22; SEQ ID NO. 16, 19, 20 y 23; SEQ ID NO. 16, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 16, 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 16, 20, 22 y 23; SEQ ID NO. 17, 18, 19 y 20; SEQ ID NO. 17, 18, 19 y 21; SEQ ID NO. 17, 18, 19 y 22; SEQ ID NO. 17, 18, 19 y 23; SEQ ID NO. 17, 19, 20 y 21; SEQ ID NO. 17, 19, 20 y 22; SEQ ID NO. 17, 19, 20 y 23; SEQ ID NO. 17, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 17, 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 17, 21, 22 y 23; SEQ ID NO. 18, 19, 20 y 21; SEQ ID NO. 18, 19, 20 y 22; SEQ ID NO. 18, 19, 20 y 23; SEQ ID NO. 18, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 18, 20, 22 y 23; SEQ ID NO. 18, 21, 22 y 23; SEQ ID NO. 19, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 19, 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 19, 21, 22 y 23; SEQ ID NO. 20, 21, 22 y 23.

65

5 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Adalimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19 y 20; SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19, y 21; SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19 y 22; SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19 y 23; SEQ ID NO. 16, 18, 19, 20 y 21; SEQ ID NO. 16, 18, 19, 20 y 22; SEQ ID NO. 16, 18, 19, 20 y 23; SEQ ID NO. 16, 19, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 16, 19, 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 16, 20, 21, 22 y 23; SEQ ID NO. 17, 18, 19, 20 y 21; SEQ ID NO. 17, 18, 19, 20 y 22; SEQ ID NO. 17, 18, 19, 20 y 23; SEQ ID NO. 17, 19, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 17, 19, 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 17, 20, 21, 22 y 23; SEQ ID NO. 18, 19, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 18, 19, 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 18, 20, 21, 22 y 23; SEQ ID NO. 19, 20, 21, 22 y 23.

10 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Adalimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan seis péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19, 20 y 21; SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19, 20 y 22; SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19, 20 y 23; SEQ ID NO. 16, 18, 19, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 16, 18, 19, 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 16, 19, 20, 21, 22 y 23; SEQ ID NO. 17, 18, 19, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 17, 18, 19, 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 17, 19, 20, 21, 22 y 23; SEQ ID NO. 18, 19, 20, 21, 22 y 23;

15 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Adalimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan siete péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 16, 18, 19, 20, 21, 22 y 23; SEQ ID NO. 17, 18, 19, 20, 21 y 22; SEQ ID NO. 17, 18, 19, 20, 21 y 23; SEQ ID NO. 17, 19, 20, 21, 22 y 23; SEQ ID NO. 18, 19, 20, 21, 22 y 23;

20 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Adalimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan ocho péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

25 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina y en las que se usa un homólogo marcado de Certolizumab como compuesto de patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de 1 a 7 abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 péptidos de proteólisis seleccionados.

30 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Certolizumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

35 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Certolizumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

40 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Certolizumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan cuatro péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 24, 25, 26 y 27; SEQ ID NO. 24, 25 y 28; 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.

45 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Certolizumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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; SEQ ID NO. 27, 28, 29 y 30.

50 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Certolizumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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, 29 y 30; SEQ ID NO. 26, 27, 28, 29 y 30.

En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Certolizumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan seis péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

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

10 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina y en las que se usa un homólogo marcado de Golimumab como compuesto de patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de 1 a 7 abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 péptidos de proteólisis seleccionados.

15 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Golimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

20 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Golimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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. 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.

25 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Golimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan cuatro péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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. 33, 34, 35 y 36; SEQ ID NO. 33, 34, 35 y 37; SEQ ID NO. 33, 35, 36 y 37; SEQ ID NO. 33, 36 y 37; SEQ ID NO. 34, 35, 36 y 37.

30 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Golimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

35 En las realizaciones en las que se cuantifican anticuerpos anti-TNF y en las que se usa un homólogo marcado de Golimumab como compuesto de patrón interno, en las que se controlan seis péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la 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.

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

45 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa un homólogo marcado de Trastuzumab como compuesto de patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de forma destacable de acuerdo con el número de péptidos de proteólisis disponibles. El número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de 1 a 7 péptidos de proteólisis, dependiendo del número de péptidos de proteólisis que están disponibles, que abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 péptidos de proteólisis seleccionados.

50

5 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa un homólogo marcado de Trastuzumab como compuesto de patrón interno y en las que se controlan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 48 y 49, SEQ ID NO.48 y 50, SEQ ID NO.48 y 51, SEQ ID NO.48 y 52, SEQ ID NO.48 y 53, SEQ ID NO.49 y 50, SEQ ID NO.49 y 51, SEQ ID NO.49 y 52, SEQ ID NO.49 y 53, SEQ ID NO.50 y 51, SEQ ID NO.50 y 52, SEQ ID NO.50 y 53, SEQ ID NO.51 y 52, SEQ ID NO.51 y 53, y SEQ ID NO.52 y 53.

10 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa un homólogo marcado de Trastuzumab como compuesto de patrón interno y en las que se controlan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 48, 49 y 50; SEQ ID NO. 48, 49 y 51; SEQ ID NO. 48, 49 y 52; SEQ ID NO. 48, 49 y 53; SEQ ID NO. 48, 50 y 51; SEQ ID NO. 48, 50 y 52; SEQ ID NO. 48, 50 y 53; SEQ ID NO. 48, 51 y 52; SEQ ID NO. 48, 51 y 53; SEQ ID NO. 48; 52 y 53; SEQ ID NO. 49, 50 y 51; SEQ ID NO. 49, 50 y 52; SEQ ID NO. 49, 50 y 53; SEQ ID NO. 49, 51 y 52; SEQ ID NO. 49, 51 y 53; SEQ ID NO. 49, 52 y 53; SEQ ID NO. 50, 51, y 52; SEQ ID NO. 50, 51 y 53; SEQ ID NO. 50, 52 y 53, SEQ ID NO. 51, 52 y 53.

20 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa un homólogo marcado de Trastuzumab como compuesto de patrón interno y en las que se controlan cuatro péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 48, 49, 50 y 51; SEQ ID NO. 48, 49, 50 y 52; SEQ ID NO. 48, 49, 50, y 53; SEQ ID NO. 48, 50, 51 y 52; SEQ ID NO. 48, 50, 51 y 53; SEQ ID NO. 48, 50, 52 y 53; SEQ ID NO. 48, 51, 52 y 53; SEQ ID NO. 49, 50, 51 y 52; SEQ ID NO. 49, 50, 51 y 53; SEQ ID NO. 49, 50, 52 y 53; SEQ ID NO. 49, 51, 52 y 53; SEQ ID NO. 50, 51, 52 y 53.

25 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa un homólogo marcado de Trastuzumab como compuesto de patrón interno y en las que se controlan cinco péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 48, 49, 50, 51 y 52; SEQ ID NO. 48, 49, 50, 51 y 53; SEQ ID NO 48, 49, 50, 52 y 53; SEQ ID NO 48, 49, 51, 52 y 53; SEQ ID NO. 48, 50, 51, 52 y 53; SEQ ID NO 49, 50, 51, 52, y 53.

35 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa un homólogo marcado de Rituximab como compuesto de patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de forma destacable de acuerdo con el número de péptidos de proteólisis disponibles. El número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de 1 a 10 péptidos de proteólisis, dependiendo del número de péptidos de proteólisis que están disponibles, que abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 40 9 y 10 péptidos de proteólisis seleccionados.

45 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa un homólogo marcado de Rituximab como compuesto de patrón interno y en las que se controlan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 54 y 55, SEQ ID NO.54 y 56, SEQ ID NO.54 y 57, SEQ ID NO.54 y 58, SEQ ID NO.54 y 59, SEQ ID NO.54 y 60, SEQ ID NO.54 y 61, SEQ ID NO.54 y 62, SEQ ID NO.54 y 63, SEQ ID NO.54 y 64, SEQ ID NO.55 y 56, SEQ ID NO.55 y 57, SEQ ID NO.55 y 58, SEQ ID NO.55 y 59, SEQ ID NO.55 y 60, SEQ ID NO.55 y 61, SEQ ID NO.55 y 62, SEQ ID NO.55 y 63, SEQ ID NO.55 y 64, SEQ ID NO.56 y 57, SEQ ID NO.56 y 58, SEQ ID NO.56 y 59, SEQ ID NO.56 y 60, SEQ ID NO.56 y 61, SEQ ID NO.56 y 62, SEQ ID NO.56 y 63, SEQ ID NO.56 y 64, SEQ ID NO.57 y 58, SEQ ID NO.57 y 59, SEQ ID NO.57 y 60, SEQ ID NO.57 y 61, SEQ ID NO.57 y 62, SEQ ID NO.57 y 63, SEQ ID NO.57 y 64, SEQ ID NO.58 y 59, SEQ ID NO.58 y 60, SEQ ID NO.58 y 61, SEQ ID NO.58 y 62, SEQ ID NO.58 y 63, SEQ ID NO.58 y 64, SEQ ID NO.59 y 60, SEQ ID NO.59 y 61, SEQ ID NO.59 y 62, SEQ ID NO.59 y 63, SEQ ID NO.59 y 64, SEQ ID NO.60 y 61, SEQ ID NO.60 y 62, SEQ ID NO.60 y 63, SEQ ID NO.60 y 64, SEQ ID NO.61 y 62, SEQ ID NO.61 y 63, SEQ ID NO.61 y 64, SEQ ID NO.62 y 63, SEQ ID NO.63 y 64.

60 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o un composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa un homólogo marcado de Rituximab como compuesto de patrón interno y en las que se controlan tres péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 54, 55 y 56; SEQ ID NO. 54, 55 y 57; SEQ ID NO. 54, 55 y 58; SEQ ID NO. 54, 55 y 59; SEQ ID NO. 54, 55 y 60; SEQ ID NO. 54, 55 y 61; SEQ ID NO. 54, 55 y 62; SEQ ID NO. 54, 55 y 63; SEQ ID NO. 54, 55 y 64; SEQ ID NO. 54, 56 y 57; SEQ ID NO. 54, 56 y 58; SEQ ID NO. 54, 56 y 59; SEQ ID NO. 54, 56 y 60; SEQ ID NO. 54, 56 y 61; SEQ ID NO. 54, 56 y 62; SEQ ID NO. 54, 56 y 63; SEQ ID NO. 54, 56 y 64; SEQ ID NO. 54, 57 y 58; SEQ ID NO. 54, 57 y 59; SEQ ID NO. 54, 57 y 60; SEQ ID NO. 54, 57 y 61; SEQ ID NO. 54, 57 y 62; SEQ ID NO. 54, 57 y 63; SEQ ID NO. 54, 57 y 64; SEQ ID NO. 54, 58 y 59; SEQ ID NO. 54, 58 y 60; SEQ ID NO. 54, 58 y 61; SEQ ID NO. 54, 58 y 62; SEQ ID NO. 54, 58 y 63; SEQ ID NO. 54, 58 y 64; SEQ

5 ID NO. 54; 59 y 60; SEQ ID NO. 54, 59 y 61; SEQ ID NO. 54, 59 y 62; SEQ ID NO. 54, 59 y 63; SEQ ID NO. 54, 59 y 64; SEQ ID NO. 54, 60 y 61; SEQ ID NO. 54, 60 y 62; SEQ ID NO. 54, 60 y 63; SEQ ID NO. 54, 60 y 64; SEQ ID NO. 54, 61 y 62; SEQ ID NO. 54, 61 y 63; SEQ ID NO. 54, 61 y 64; SEQ ID NO. 55, 56 y 57; SEQ ID NO. 55, 56 y 58; SEQ ID NO. 55, 56 y 59; SEQ ID NO. 55, 56 y 60; SEQ ID NO. 55, 56 y 61; SEQ ID NO. 55, 56 y 62; SEQ ID NO. 55, 56 y 63; SEQ ID NO. 55, 56 y 64; SEQ ID NO. 55, 57 y 58; SEQ ID NO. 55, 57 y 59; SEQ ID NO. 55, 57 y 60; SEQ ID NO. 55, 57 y 61; SEQ ID NO. 55, 58 y 59; SEQ ID NO. 55, 58 y 60; SEQ ID NO. 55, 58 y 61; SEQ ID NO. 55, 58 y 62; SEQ ID NO. 55, 58 y 63; SEQ ID NO. 55, 58 y 64; SEQ ID NO. 55, 59 y 60; SEQ ID NO. 55, 59 y 61; SEQ ID NO. 55, 59 y 62; SEQ ID NO. 55, 59 y 63; SEQ ID NO. 55, 59 y 64; SEQ ID NO. 55, 60 y 61; SEQ ID NO. 55, 60 y 62; SEQ ID NO. 55, 60 y 63; SEQ ID NO. 55, 60 y 64; SEQ ID NO. 55, 61 y 62; SEQ ID NO. 55, 61 y 63; SEQ ID NO. 55, 61 y 64; SEQ ID NO. 55, 62 y 63; SEQ ID NO. 55, 62 y 64; SEQ ID NO. 55, 63 y 64; SEQ ID NO. 56, 57, y 58; SEQ ID NO. 56, 57 y 59; SEQ ID NO. 56, 57 y 60; SEQ ID NO. 56, 57 y 61; SEQ ID NO. 56, 57 y 62; SEQ ID NO. 56, 57 y 63; SEQ ID NO. 56, 57 y 64; SEQ ID NO. 56, 58 y 59; SEQ ID NO. 56, 58 y 60; SEQ ID NO. 56, 58 y 61; SEQ ID NO. 56, 58 y 62; SEQ ID NO. 56, 58 y 63; SEQ ID NO. 56, 58 y 64; SEQ ID NO. 56, 59 y 60; SEQ ID NO. 56, 59 y 61; SEQ ID NO. 56, 59 y 62; SEQ ID NO. 56, 59 y 63; SEQ ID NO. 56, 59 y 64; SEQ ID NO. 56, 60 y 61; SEQ ID NO. 56, 60 y 62; SEQ ID NO. 56, 60 y 63; SEQ ID NO. 56, 60 y 64; SEQ ID NO. 56, 61 y 62; SEQ ID NO. 56, 61 y 63; SEQ ID NO. 56, 61 y 64; SEQ ID NO. 57, 58 y 59; SEQ ID NO. 57, 58 y 60; SEQ ID NO. 57, 58 y 61; SEQ ID NO. 57, 58 y 62; SEQ ID NO. 57, 58 y 63; SEQ ID NO. 57, 58 y 64; SEQ ID NO. 57, 59 y 60; SEQ ID NO. 57, 59 y 61; SEQ ID NO. 57, 59 y 62; SEQ ID NO. 57, 59 y 63; SEQ ID NO. 57, 59 y 64; SEQ ID NO. 57, 60 y 61; SEQ ID NO. 57, 60 y 62; SEQ ID NO. 57, 60 y 63; SEQ ID NO. 57, 60 y 64; SEQ ID NO. 57, 61 y 62; SEQ ID NO. 57, 61 y 63; SEQ ID NO. 57, 61 y 64; SEQ ID NO. 57, 62 y 63; SEQ ID NO. 57, 62 y 64; SEQ ID NO. 57, 63 y 64; SEQ ID NO. 58, 59 y 60; SEQ ID NO. 58, 59 y 61; SEQ ID NO. 58, 59 y 62; SEQ ID NO. 58, 59 y 63; SEQ ID NO. 58, 59 y 64; SEQ ID NO. 58, 60 y 61; SEQ ID NO. 58, 60 y 62; SEQ ID NO. 58, 60 y 63; SEQ ID NO. 58, 60 y 64; SEQ ID NO. 58, 61 y 62; SEQ ID NO. 58, 61 y 63; SEQ ID NO. 58, 61 y 64; SEQ ID NO. 58, 62 y 63; SEQ ID NO. 58, 62 y 64; SEQ ID NO. 58, 63 y 64; SEQ ID NO. 59, 60 y 61; SEQ ID NO. 59, 60 y 62; SEQ ID NO. 59, 60 y 63; SEQ ID NO. 59, 60 y 64; SEQ ID NO. 59, 61 y 62; SEQ ID NO. 59, 61 y 63; SEQ ID NO. 59, 61 y 64; SEQ ID NO. 59, 62 y 63; SEQ ID NO. 59, 62 y 64; SEQ ID NO. 59, 63 y 64; SEQ ID NO. 60, 61 y 62; SEQ ID NO. 60, 61 y 63; SEQ ID NO. 60, 61 y 64; SEQ ID NO. 60, 62 y 63; SEQ ID NO. 60, 62 y 64; SEQ ID NO. 60, 63 y 64; SEQ ID NO. 61, 62 y 63; SEQ ID NO. 61, 62 y 64; SEQ ID NO. 61, 63 y 64; SEQ ID NO. 62, 63 y 64.

10 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa un homólogo marcado de Bevacizumab como compuesto de patrón interno, el número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de forma destacable de acuerdo con el número de péptidos de proteólisis disponibles. El número de péptidos de proteólisis seleccionados para el que se determina una relación de señal espectrométrica de masas en la etapa c) puede variar de 1 a 8 péptidos de proteólisis, dependiendo del número de péptidos de proteólisis que están disponibles, que abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 péptidos de proteólisis seleccionados.

15 En las realizaciones en las que la etapa de proteólisis se realiza usando tripsina o una composición de proteasas que contiene tripsina, en las que se cuantifican anticuerpos antineoplásicos y en las que se usa un homólogo marcado de Bevacizumab como compuesto de patrón interno y en las que se controlan dos péptidos de proteólisis seleccionados, estos pueden seleccionarse en un grupo que comprende la SEQ ID NO. 65 y 66, SEQ ID NO. 65 y 67, SEQ ID NO. 65 y 68, 65 y 69, 65 y 70, 65 y 71, 65 y 72, 66 y 67, 66 y 68, 66 y 69, 66 y 70, SEQ ID NO. 66 y 71, SEQ ID NO. 66 y 72, SEQ ID NO. 67 y 68, SEQ ID NO. 67 y 69, SEQ ID NO. 67 y 70, SEQ ID NO. 67 y 71, SEQ ID NO. 67 y 72, SEQ ID NO. 68 y 69, SEQ ID NO. 68 y 70, SEQ ID NO. 68 y 71, SEQ ID NO. 68 y 72, SEQ ID NO. 69 y 70, SEQ ID NO. 69 y 71, SEQ ID NO. 69 y 72, SEQ ID NO. 70 y 71, SEQ ID NO. 71 y 72.

20 Para realizar el método de cuantificación de anticuerpos terapéuticos de la invención, en el que la etapa de proteólisis b) hace uso de una proteasa dirigida a la bisagra, el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan en un grupo que comprende:

25 *para Infliximab*: péptidos de la SEQ ID NO. 38-39,
para Etanercept: péptido de la SEQ IDNO. 40,
para Adalimumab: péptidos de la SEQ IDNO. 41-42,
para Certolizumab: péptidos de la SEQ ID NO. 43-44, y
para Golimumab: péptidos de la SEQ ID NO. 45-46

30 En algunas realizaciones, en las que la etapa de proteólisis se realiza usando una proteasa dirigida a la bisagra y en las que se usa un homólogo marcado de Infliximab como compuesto de patrón interno, las señales espectrométricas de uno o los dos péptidos de proteólisis seleccionados de la SEQ ID NO. 38-39 se determinan.

35 En algunas realizaciones, en las que la etapa de proteólisis se realiza usando una proteasa dirigida a la bisagra y en las que se usa un homólogo marcado de Etanercept como compuesto de patrón interno, las señales espectrométricas de los péptidos de proteólisis seleccionados de la SEQ ID NO. 40 se determinan.

65

En algunas realizaciones, en las que la etapa de proteólisis se realiza usando una proteasa dirigida a la bisagra y en las que se usa un homólogo marcado de Adalimumab como compuesto de patrón interno, las señales espectrométricas de uno o los dos péptidos de proteólisis seleccionados de la SEQ ID NO. 41-42 se determinan.

5 En algunas realizaciones, en las que la etapa de proteólisis se realiza usando una proteasa dirigida a la bisagra y en las que se usa un homólogo marcado de Certolizumab como compuesto de patrón interno, las señales espectrométricas de uno o los dos péptidos de proteólisis seleccionados de la SEQ ID NO. 43-44 se determinan.

10 En algunas realizaciones, en las que la etapa de proteólisis se realiza usando una proteasa dirigida a la bisagra y en las que se usa un homólogo marcado de Golimumab como compuesto de patrón interno, las señales espectrométricas de uno o los dos péptidos de proteólisis seleccionados de la SEQ ID NO. 45-46 se determinan.

15 Las transiciones de SRM de péptidos proteolíticos seleccionados de los anticuerpos anti-TNF ensayados, de péptidos proteolíticos marcados de los dos o más anticuerpos anti-TNF usados como compuestos de patrón interno se establecen preferiblemente después de comparar los espectros de fragmentación obtenidos de soluciones puras de cada uno de estos péptidos, con espectros de fragmentación *in silico* generados con una herramienta de programa informático disponible pertinente, tal como el programa informático comercializado con el nombre Skyline™ de MacCoss Lab Software (EE. UU.) y la herramienta bioinformática ESP Predictor disponible en Genepattern (Vincent A. Fusaro, D. R. Mani, Jill P. Mesirov y Steven A. Carr, Nature Biotechnology (2009) 27:190-198), disponible de forma destacable en el Broad Institute (EE. UU.)

25 Preferiblemente, en la etapa d), la cuantificación de anticuerpos anti-TNF se basa en la relación 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 equivalente seleccionado de patrón interno.

De manera más precisa, la cantidad de anticuerpos anti-TNF en la muestra ensayada, por ejemplo, la concentración de dichos anticuerpos anti-TNF en la muestra de ensayo, se determina presentando el valor de relación que se calcula en la etapa d) para dicha muestra de ensayo en una curva de calibración que se generó como se describe previamente en otra parte en la presente memoria descriptiva.

30 Como se muestra en los ejemplos, la cuantificación descrita en este documento permite linealidad entre la cantidad medida (por ejemplo, concentración) de un anticuerpo anti-TNF y la cantidad esperada del mismo.

35 Cuantificar anticuerpos anti-TNF con el método de cuantificación descrito en este documento permite una alta precisión de cuantificación, una alta reproducibilidad de cuantificación, así como cuantificación de anticuerpos anti-TNF sobre un amplio intervalo de cantidades.

40 El método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de acuerdo con la invención permite una linealidad de la medida de cuantificación de 1 µg/ml o menos a 1000 µg/ml o más.

45 De acuerdo con las directrices de la FDA para validación de métodos bioanalíticos, por tanto, se muestra en este documento que el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF de acuerdo con la invención es al mismo tiempo suficientemente sensible y reproducible para cuantificar anticuerpos anti-TNF en muestras de plasma humano. Puede hacerse referencia a las directrices "Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation" del departamento de Estados Unidos de sanidad y servicios sociales - Food and Drug Administration (2001).

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

50 En algunas realizaciones, un kit de acuerdo con la invención comprende dos o más anticuerpos anti-TNF marcados isotópicamente estables, especialmente dos o más anticuerpos anti-TNF marcados isotópicamente estables seleccionados en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab. Los anticuerpos SIL pueden estar contenidos en un kit de acuerdo con la invención en cualquier combinación, especialmente en cualquiera de las combinaciones que se describen en otra parte en la presente memoria descriptiva.

55 En algunas realizaciones, dicho kit comprende dos anticuerpos anti-TNF SIL seleccionados en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab. En algunas realizaciones, dicho kit comprende tres anticuerpos anti-TNF SIL seleccionados en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab. En algunas realizaciones, dicho kit comprende cuatro anticuerpos anti-TNF SIL seleccionados en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab. En algunas realizaciones, dicho kit comprende cinco anticuerpos anti-TNF SIL seleccionados en un grupo que comprende Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab.

65 En algunas realizaciones, los anticuerpos SIL contenidos en un kit de acuerdo con la invención pueden estar en forma de una suspensión líquida. En algunas otras realizaciones, los anticuerpos SIL contenidos en un kit de acuerdo con la invención pueden estar en forma liofilizada.

5 En algunas realizaciones, dicho kit comprende además reactivos necesarios para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en este documento, tal como una proteasa apropiada, especialmente una proteasa seleccionada en un grupo que comprende (i) tripsina o una composición que contiene tripsina y (ii) una proteasa dirigida a la bisagra.

En algunas realizaciones, dicho kit también comprende información que proporciona las curvas de calibración para cada uno de los anticuerpos terapéuticos contenidos en el mismo.

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

En algunas realizaciones, dicho kit también comprende información que proporciona las curvas de calibración para cada uno de los anticuerpos antineoplásicos contenidos en el mismo.

15 En algunas realizaciones, dicho kit comprende además reactivos necesarios para realizar el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en este documento, tal como una proteasa apropiada, especialmente una proteasa seleccionada en un grupo que comprende (i) tripsina o una composición que contiene tripsina y (ii) una proteasa dirigida a la bisagra.

20 La presente invención se ilustra adicionalmente, sin limitarse a los mismos, mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

25 **A. Materiales y métodos (ejemplos 1 y 2)**

A.1. Preparación de muestra de ensayo

La muestra de ensayo es una muestra de plasma o una muestra de suero que se recogió previamente de un paciente a ensayar.

30 El patrón de Infliximab mAb PSAQ se añade en la muestra de ensayo 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 (idealmente 20 µg/ml).

35 El volumen de muestra usado para los experimentos está comprendido entre 5 µl y 1000µl, más preferiblemente entre 10 µl y 100 µl, e idealmente es 10 µl.

A 10 µl de muestra de suero (hasta 50 µl), se le añade el patrón de Infliximab marcado a una concentración de 25 µg/ml (por ejemplo, se añade 1 µl de una solución [250 ng/µl]). Se añade PBS IX para obtener un volumen de muestra final de 100 µl.

40 **A.2. Reducción de proteína que no es de anticuerpo por cromatografía de afinidad**

45 De acuerdo con esta realización, la reducción en proteínas que no son de anticuerpo se realiza usando un soporte de cromatografía de afinidad en que se inmovilizó TNF alfa. De manera más precisa, de acuerdo con este método, se añade TNF alfa biotinilado a la muestra de ensayo añadida previamente para capturar las moléculas de unión a TNF que están presentes en la muestra de ensayo añadida, que incluye (i) los anticuerpos anti-TNF marcados con isótopo estables (SIL) usados como patrones internos y (ii) los otros anticuerpos anti-TNF que posiblemente están presentes en la muestra de ensayo antes de añadir los anticuerpos anti-TNF SIL.

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

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

55 Este método puede denominarse MSIA (para inmunofinidad por espectrometría de masas - Mass Spectrometry ImmunoAffinity).

Reactivos e instrumentos específicos

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

65 ***Preparación de la solución de TNF-alfa biotinilado***

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

Experimento de MSIA

5 Se programa la siguiente etapa en el programa de MSIA:
Se cargan puntas de MSIA de estreptavidina en la pipeta.

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

10 Se selecciona la etapa LAVAR y se lavan las puntas con PBS 1X (volumen de PBS requerido = 200 µl).

Se selecciona la etapa CAPTURA 1 y se aspira la solución de TNF-alfa biotinilado.

15 Se selecciona la etapa LAVAR y se aclaran las puntas con PBS 1X (volumen de PBS requerido = 200 µl).

Se repite esta etapa dos veces.

20 Se selecciona la etapa CAPTURA 2 y se aspira la solución de muestra de suero.

Se selecciona la etapa LAVAR y se aclaran las puntas con solución de hidróxido de amonio (volumen requerido = 200 µl). Se repite esta etapa y después LAVAR con agua ultrapura 200 mM. Se repite esta etapa dos veces.

25 Se selecciona la etapa ELUIR y se eluye con solución de acetonitrilo al 30 %/ácido fórmico al 0,05 % (volumen mínimo requerido = 100 µl).

Se recupera el eluido en un tubo de baja adsorción y se seca la muestra con vacío por velocidad.

A.3. Etapa de proteólisis enzimática

30 La etapa de proteólisis enzimática puede realizarse de acuerdo con una pluralidad de realizaciones. En algunas realizaciones, la proteólisis enzimática se realiza a través de un método que comprende dos etapas de digestión con tripsina, (i) una etapa de digestión con tripsina en condiciones desnaturalizantes seguida de (ii) una etapa de digestión con tripsina en condiciones no desnaturalizantes, que es el método denominado "opción 1" posteriormente en este documento. En algunas otras realizaciones, la proteólisis enzimática se realiza a través de un método que comprende una etapa de digestión con tripsina en condiciones no desnaturalizantes, que es el método denominado "opción 2" posteriormente en este documento. En otras realizaciones más, la proteólisis enzimática se realiza usando una proteasa dirigida a la bisagra tal como ideS (enzima degradante de inmunoglobulina de *Streptococcus*), que es el método denominado "opción 3" posteriormente en este documento.

40 **Opción 1: digestión con tripsina de dos etapas**

Digestión con tripsina en condiciones desnaturalizantes

45 Después de completarse el secado, se añaden 10 µl de solución de urea 4 M en el tubo y se agita con vórtice. Se comprueba el pH de la muestra que debe ser > 6. Si no, se ajusta el pH hasta 7-8 con solución de base Tris 0,5 M.

Se añaden 2 µg de EndolysC de la mezcla de ENdolysC/tripsina (la cantidad de EndolysC añadida puede variar entre 0,2 y 4 µg).

50 Se procesa para la predigestión a 37 °C durante 2 h.

Digestión con tripsina en condiciones no desnaturalizantes

55 Se añaden 190 µl de una solución de bicarbonato de amonio 25 mM en el tubo, se mezcla y se añaden 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). Se procesa para la digestión a 37 °C durante 2-4 h o durante una noche si se prefiere.

Se desala y se concentra la muestra con C18-ziptip (Proteabio), se eluye ziptip, se seca el eluido.

60 Antes de la inyección, se resuspende la muestra en 20 µl de una solución de acetonitrilo al 2 %, ácido fórmico al 0,1 %.

Se inyecta la muestra en el instrumento de CL-EM.

Opción 2: Digestión con tripsina de una etapa

5 Después de completarse el secado, se añaden 10 µl de solución de bicarbonato de amonio 25 mM en el tubo y se agita con vórtice. Se comprueba el pH de la muestra que debe ser > 6. Si no, se ajusta el pH hasta 7-8 con solución de base Tris 0,5 M. Se añaden 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). Se procesa para la digestión a 37 °C durante 2-4 h o durante una noche si se prefiere.

10 Se añade ácido fórmico en la muestra para detener la digestión para obtener una concentración final de un 0,1 %.

Se inyecta la muestra en el instrumento de CL-EM.

Opción 3: Digestión con proteasa con ideS

15 Después de completarse el secado, se resuspende la muestra en fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 o similar con pH que varía de 6,0-8,0 y se comprueba el pH (se ajusta con base Tris si es necesario).

20 Se rompe el precinto inferior de la columna FragIT™ (se guarda el tapón) y se abre ligeramente la tapa ~90° en dirección contraria a las agujas del reloj.

Se coloca la columna en un tubo de recogida de 1,5-2 ml y se centrifuga la columna a 200×g durante 1 min para retirar la solución de almacenamiento.

25 Se equilibra la columna añadiendo 300 µl de tampón de escisión y se centrifuga la columna a 200×g durante 1 min.

Se repiten las etapas 5 y 6 dos veces.

Se pone el tapón inferior en la columna.

30 Se añade inmediatamente la muestra a escindir en un volumen de 100 µl a una concentración máxima de 5 mg/ml de IgG en tampón de escisión. Se precinta la columna con la tapa superior. Se tiene cuidado de suspender completamente el medio manualmente y se garantiza que esté fluyendo en la columna. Se incuba la columna mezclando extremo sobre extremo durante 15 min en temperatura ambiente. El tiempo de incubación puede aumentarse sin sobredigestión de la IgG.

35 Se retira la tapa superior y el tapón inferior. Se coloca la columna en un tubo de recogida de 1,5-2 ml. Se centrifuga la columna a 1000×g durante 1 min para eluir la muestra. Para una recuperación máxima de la muestra, se repite dos veces esta etapa usando 100 µl de tampón de escisión. Se centrifuga la columna a 1000×g durante 1 min para eluir la muestra. Se combinan todas las fracciones de elución.

40 Si se requiere, se usa C4 ziptip para desalar la muestra o se precipita con acetona fría, se seca y se resuspende en ACN al 2 %, tampón FA al 0,1 %.

A.4. Análisis por CL-EM de muestras tratadas con opción 1 u opción 2 (digestión con tripsina)

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

50 Estos péptidos deben controlarse en sus formas marcadas y no marcadas (el incremento de masa se calculará de acuerdo con el aminoácido marcado isotópicamente estable presente en la secuencia peptídica). También deben tenerse en cuenta las posibles modificaciones químicas que afectan a los aminoácidos ya que estas modificaciones modificarán el m/z de los iones del péptido y los correspondientes fragmentos.

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

55 Los siguientes péptidos de secuencias de la SEQ ID NO. 38 a 46 deben controlarse en el ensayo de CL-SRM.

60 Estos péptidos deben controlarse en sus formas marcadas y no marcadas (el incremento de masa se calculará de acuerdo con el aminoácido marcado isotópicamente estable presente en la secuencia peptídica). También deben tenerse en cuenta las posibles modificaciones químicas que afectan a los aminoácidos ya que estas modificaciones modificarán el m/z de los iones del péptido y los correspondientes fragmentos.

B. Materiales y métodos (ejemplo 3)**B.1. Preparación de muestra de ensayo**

5 La muestra de ensayo es una muestra de plasma o una muestra de suero que se recogió previamente de un paciente a ensayar.

10 El patrón de Trastuzumab mAb PSAQ se añade en la muestra de ensayo 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 (idealmente 20 µg/ml).

El volumen de muestra usado para los experimentos está comprendido entre 5 µl y 1000µl, más preferiblemente entre 10 µl y 100 µl, e idealmente es 10 µl.

15 A 10 µl de muestra de suero (hasta 50 µl), se le añade el patrón de Infliximab marcado a una concentración de 25 µg/ml (por ejemplo, se añade 1 µl de una solución [250 ng/µl]). Se añade PBS IX para obtener un volumen de muestra final de 500 µl.

B.2. Reducción de albúmina usando una resina de afinidad por albúmina

20 De acuerdo con esta realización, la muestra reduce de la albúmina usando una resina de afinidad por albúmina, que está disponible en el mercado (agarosa Cibacron-blue 3GA, Sigma-Aldrich). De manera más precisa, de acuerdo con este método, la albúmina presente en la muestra de ensayo se retira específicamente, mientras las otras proteínas permanecen en el sobrenadante, que incluye (i) los anticuerpos terapéuticos marcados con isótopo estables (SIL) usados como patrones internos y (ii) los otros anticuerpos terapéuticos que están finalmente presentes en la muestra de ensayo antes de añadir los anticuerpos terapéuticos SIL. El sobrenadante, reducido de albúmina, se recupera y se somete potencialmente a un tratamiento de reducción/alquilación (véase la sección B.3). Antes de continuar a la digestión, las proteínas restantes contenidas en la muestra se precipitan usando 10 volúmenes de acetona fría.

B.3. Esta de reducción/alquilación

30 La muestra en primer lugar se somete a una etapa de reducción, que tiene como objetivo reducir los enlaces disulfuro. Se añade TCEP (Tris(2-carboxietil)fosfina) a la muestra a una concentración final de 10 mM. La muestra se incuba a temperatura ambiente durante 20 min. Entonces se añade yodoacetamida (preparada de manera improvisada) en la muestra a una concentración final de 100 mM. La muestra entonces se incuba en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 45 min. Entonces, la muestra se somete a precipitación con acetona. Si no, la yodoacetamida restante presente en la muestra puede inactivarse añadiendo TCEP.

Reactivos e instrumentos específicos

40 Resina de agarosa Cibacron-blue 3GA (Sigma-Aldrich), Herceptin (Roche), solución salina tamponada con fosfato (Gibco LifeSciences), Tris(2-carboxietil)fosfina (SIGMA-Aldrich), yodoacetamida (Sigma-Aldrich), acetona (Sigma-Aldrich), solución de urea 8 M (Sigma-Aldrich), CL-EM de acetonitrilo Chromasolv (Sigma-Aldrich), ácido fórmico Aristar (VWR), mezcla de EndoLysC/tripsina PROMEGA.

B.3. Etapa de proteólisis enzimática

50 La etapa de proteólisis enzimática puede realizarse de acuerdo con una pluralidad de realizaciones. En algunas realizaciones, la proteólisis enzimática se realiza a través de un método que comprende dos etapas de digestión con tripsina, (i) una etapa de digestión con tripsina en condiciones desnaturizantes seguida de (ii) una etapa de digestión con tripsina en condiciones no desnaturizantes, que es el método denominado "opción 1" posteriormente en este documento. En algunas otras realizaciones, la proteólisis enzimática se realiza a través de un método que comprende una etapa de digestión con tripsina en condiciones no desnaturizantes, que es el método denominado "opción 2" posteriormente en este documento.

Opción 1: digestión con tripsina de dos etapas***Digestión con tripsina en condiciones desnaturizantes***

60 Después de completarse el secado, se añaden 10 µl de solución de urea 4 M en el tubo y se agita con vórtice. Se comprueba el pH de la muestra que debe ser > 6. Si no, se ajusta el pH hasta 7-8 con solución de base Tris 0,5 M.

65 Se añaden 2 µg de EndoLysC de la mezcla de ENdoLysC/tripsina (la cantidad de EndoLysC añadida puede variar entre 0,2 y 4 µg).

Se procesa para la predigestión a 37 °C durante 2 h.

Digestión con tripsina en condiciones no desnaturalizantes

5 Se añaden 190 µl de una solución de bicarbonato de amonio 25 mM en el tubo, se mezcla y se añaden 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). Se procesa para la digestión a 37 °C durante 2-4 h o durante una noche si se prefiere.

Se desala y se concentra la muestra con C18-ziptip (Proteabio), se eluye ziptip, se seca el eluido.

10 Antes de la inyección, se resuspende la muestra en 20 µl de una solución de acetonitrilo al 2 %, ácido fórmico al 0,1 %.

Se inyecta la muestra en el instrumento de CL-EM.

Opción 2: Digestión con tripsina de una etapa

15 Después de completarse el secado, se añaden 10 µl de solución de bicarbonato de amonio 25 mM en el tubo y se agita con vórtice. Se comprueba el pH de la muestra que debe ser > 6. Si no, se ajusta el pH hasta 7-8 con solución de base Tris 0,5 M. Se añaden 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). Se procesa para la digestión a 37 °C durante 2-4 h o durante una noche si se prefiere.

Se añade ácido fórmico en la muestra para detener la digestión para obtener una concentración final de un 0,1 %.

25 Se inyecta la muestra en el instrumento de CL-EM.

B.4. Análisis por CL-EM de muestras tratadas con opción 1 u opción 2 (digestión con tripsina)

Los siguientes péptidos de secuencias de la SEQ ID NO. 48 a 73 deben controlarse en el ensayo de CL-SRM.

30 Estos péptidos deben controlarse en sus formas marcadas y no marcadas (el incremento de masa se calculará de acuerdo con el aminoácido marcado isotópicamente estable presente en la secuencia peptídica). También deben tenerse en cuenta las posibles modificaciones químicas que afectan a los aminoácidos ya que estas modificaciones modificarán el m/z de los iones del péptido y los correspondientes fragmentos.

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

40 El objetivo de este experimento fue realizar una curva de valoración para evaluar los rendimientos de los patrones de anticuerpos marcados isotópicamente estables (SIL) y del método de CL-EM/EM.

45 En el ejemplo 1, se realizó una curva de valoración usando (i) anticuerpos anti-TNF no marcados como compuestos de patrón interno y (ii) Infliximab SIL como anticuerpo anti-TNF a cuantificar. De hecho, puede realizarse el mismo experimento usando (i) anticuerpos anti-TNF SIL como compuestos de patrón interno y (ii) un Infliximab no marcado como anticuerpo anti-TNF a cuantificar.

A) Protocolo

50 Se generó una curva de valoración, de acuerdo con el siguiente protocolo 1) añadir a una muestra de suero una cantidad definida de anticuerpos terapéuticos anti-TNF, Infliximab, Adalimumab y Etanercept y 2) añadir una cantidad creciente de Infliximab SIL. Por tanto, se denomina curva de valoración inversa porque el Infliximab SIL se cuantifica usando el Infliximab terapéutico.

55 Dicho experimento imita una situación donde un paciente se habría tratado con Infliximab y cuyo suero se analizará usando nuestro método de CE-EM/EM y tres patrones anti-TNF.

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

Tabla 1: Las muestras se constituyeron y analizaron para evaluar la exactitud y precisión de nuestro método de CL-EM/EM en un contexto donde están presentes múltiples anticuerpos anti-TNF en la muestra.

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

B) Resultados experimentales

5 Los rendimientos de cuantificación proporcionados por nuestra estrategia que combina el uso de patrones de mAb SIL y CL-EM/EM se evaluaron de una manera combinada, donde tres diferentes anticuerpos anti-TNF estaban presentes simultáneamente en las muestras de suero humano. Para estos ensayos, se ha producido una curva de valoración inversa que cubre un intervalo de concentración entre 1 µg/ml y 100 µg/ml. En este experimento, la exactitud obtenida para 10 µg/ml y 100 µg/ml estuvo por debajo de un 20 %. Los resultados se representan en la figura 1. La ecuación de regresión media fue $Y = 1,19 \times X$ con un coeficiente de correlación R^2 de 0,999. Para cada punto de concentración, 10 los datos obtenidos de los péptidos controlados fueron coherentes, lo que indica que nuestra estrategia es robusta. La exactitud estuvo por debajo de un 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 terapéutico anti-TNF presente en la sangre de un paciente usando una estrategia genérica y con enmascaramiento, combinando el uso de un patrón de anticuerpo SIL y CL-EM.

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

20 De manera más interesante, los resultados experimentales muestran que el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en este documento no requiere una selección de un método de cuantificación específico de anticuerpo 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 está documentado erróneamente, y también permite determinar concentraciones de anticuerpos anti-TNF en muestras de ensayo de pacientes que han experimentado tratamientos de politerapia anti-TNF. Finalmente, el método de cuantificación de anticuerpos 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

30 El objetivo de este experimento fue evaluar, usando un solo anticuerpo anti-TNF Infliximab, la concentración máxima que puede medirse con exactitud usando nuestra estrategia de cuantificación de anticuerpos anti-TNF.

A) Protocolo

35 Para realizar este experimento, el anticuerpo terapéutico Infliximab se obtuvo de colaboradores. El Infliximab SIL se produjo y se purificó de acuerdo con el método descrito previamente (Lebert *et al.*, Bioanalysis, 2015). Las muestras se trataron usando materiales y métodos descritos en la sección A. Las muestras se trataron siguiendo la opción 1 descrita en la sección A. Los péptidos de secuencias de la SEQ ID NO. 1 a 8 se controlaron en el ensayo de CL-SRM, 40 en sus formas marcadas y no marcadas.

Tabla 2: Las muestras se constituyeron y analizaron para evaluar la saturación del antígeno TNF alfa usando una estrategia de tecnología MSIA.

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

B) Resultados experimentales

45 El experimento realizado en este caso tenía como objetivo evaluar la concentración máxima de anticuerpos anti-TNF que puede medirse con exactitud usando el método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en este

documento. Para limitar la complejidad, se evaluó usando un solo anticuerpo anti-TNF, Infliximab, que se añadió en suero humano a diferente concentración que cubría un intervalo entre 20 µg/ml y 200 µg/ml, mientras el patrón de Infliximab SIL se añadió en la misma muestra a una concentración relativamente elevada 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 permanece lineal cuando el Infliximab terapéutico está presente en la muestra a una concentración de 100 µg/ml y cuando se añade patrón de Infliximab SIL a una concentración de 40 µg/ml. Con la curva lineal obtenida, incluso se puede extrapolar que sería lineal y exacta cuando el Infliximab terapéutico está presente en la muestra a una concentración de 150 µg/ml y cuando el patrón de Infliximab SIL se añade 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 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 este documento con una técnica MSIA permite medir con exactitud un anticuerpo terapéutico anti-TNF presente en una muestra de sangre humana a una concentración igual o por debajo de 40 µg/ml usando hasta 5 anticuerpos anti-TNF SIL, cada uno añadido 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 este documento, permite medir con exactitud un anticuerpo terapéutico anti-TNF presente en una muestra de sangre humana a una concentración igual o por debajo de 150 µg/ml usando hasta 2 anticuerpos anti-TNF SIL, cada uno añadido a una concentración de 20 µg/ml (concentración total de anticuerpos anti-TNF = 40 µg/ml).

Estos resultados muestran que el protocolo de inmunoafinidad por espectrometría de masas, que es una ilustración de realizaciones del método de cuantificación de anticuerpos anti-TNF descrito en este documento, puede usarse para la cuantificación de un anticuerpo anti-TNF usando múltiples patrones de anticuerpo anti-TNF SIL.

Ejemplo 3: Evaluación de una curva de valoración para la cuantificación en muestras de suero humano del anticuerpo terapéutico Trastuzumab en presencia de otros dos anticuerpos antineoplásicos (Rituximab y Bevacizumab), usando una preparación de muestra basada en reducción en proteínas que no son de anticuerpo Cibacron®

El objetivo de este experimento fue realizar una curva de valoración para evaluar los rendimientos de los patrones de anticuerpos marcados isotópicamente estables (SIL) y del método de CL-EM/EM.

En el ejemplo 3, se realizó una curva de valoración usando (i) los anticuerpos antineoplásicos no marcados Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab como compuestos de patrón interno y (ii) Trastuzumab SIL como anticuerpo antineoplásico a cuantificar. De hecho, puede realizarse el mismo experimento usando (i) anticuerpos antineoplásicos SIL como compuestos de patrón interno y (ii) un Trastuzumab no marcado como anticuerpo antineoplásico a cuantificar.

A) Protocolo

Se generó una curva de valoración, de acuerdo con el siguiente protocolo 1) añadir a una muestra de suero una cantidad definida de anticuerpos terapéuticos, Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab y 2) añadir una cantidad creciente de Trastuzumab SIL. Por tanto, se denomina curva de valoración inversa porque el Trastuzumab SIL se cuantifica usando el Trastuzumab terapéutico.

Dicho experimento imita una situación donde un paciente se habría tratado con Trastuzumab y cuyo suero se analizará usando nuestro método de CE-EM/EM y tres patrones terapéuticos.

Para realizar este experimento, los anticuerpos terapéuticos Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab se obtuvieron de colaboradores. El Trastuzumab SIL se produjo y se purificó de acuerdo con el método descrito previamente (Lebert *et al.*, Bioanalysis, 2015). Las muestras se trataron usando materiales y métodos descritos en la sección B. Las muestras se trataron siguiendo la opción 1 descrita en la sección B. Los péptidos de secuencias de la SEQ ID NO. 47 a 73 se controlaron en el ensayo de CL-SRM, en sus formas marcadas y no marcadas.

Tabla 3: Las muestras se constituyeron y analizaron para evaluar la exactitud y precisión de nuestro método de CL-EM/EM en un contexto donde están presentes múltiples anticuerpos terapéuticos en la muestra.

Punto de intervalo	0	1	2	3	4	5
Suero humano tratado	20µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Trastuzumab SIL	0	0,5µg/ml	5µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml
Trastuzumab terapéutico	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml
Rituximab terapéutico	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml
Bevacizumab terapéutico	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	20µg/ml
Tris 20 mM, NaCl 20 mM	247µl	246µl	246µl	245µl	242µl	237µl
Volumen final de la muestra	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl

B) Resultados experimentales

5 Los rendimientos de cuantificación proporcionados por nuestra estrategia que combina el uso de patrones de mAb SIL y CL-EM/EM se evaluaron de una manera combinada, donde tres diferentes anticuerpos antineoplásicos estaban presentes simultáneamente en las muestras de suero humano. Para estos ensayos, se ha producido una curva de valoración inversa que cubre un intervalo de concentración entre 0,5 µg/ml y 50µg/ml.

10 Los resultados se representan en la figura 3. La ecuación de regresión media fue $Y = 1,243 \times X + 2,05$ con un coeficiente de correlación R^2 de 0,996. Para cada punto de concentración, los datos obtenidos de los péptidos controlados fueron coherentes, lo que indica que nuestra estrategia es robusta. Para cada punto de concentración, los datos obtenidos de los péptidos controlados fueron coherentes, lo que indica que nuestra estrategia es robusta. La alta exactitud del método demuestra que es posible cuantificar con un alto grado de precisión un anticuerpo terapéutico antineoplásico presente en la sangre de un paciente usando una estrategia genérica y con enmascaramiento, combinando el uso de un patrón de anticuerpo SIL y CL-EM.

15 Por tanto, el método puede aplicarse para el seguimiento terapéutico personalizado de pacientes tratados con anticuerpos terapéuticos antineoplásicos.

20 De manera más interesante, los resultados experimentales muestran que el método de cuantificación de anticuerpos antineoplásicos descrito en este documento no requiere una selección de un método de cuantificación específico de anticuerpo como es el caso en la presente práctica habitual. Además, el método de cuantificación de anticuerpos antineoplásicos permite corregir situaciones en las que el tratamiento de un paciente está documentado erróneamente, y también permite determinar concentraciones de anticuerpos antineoplásicos en muestras de ensayo de pacientes que han experimentado tratamientos de politerapia antineoplásica. Finalmente, el método de cuantificación de anticuerpos antineoplásicos no se ve afectado si el paciente ha recibido un primer tratamiento con anticuerpo antineoplásico y posteriormente un segundo tratamiento con un segundo anticuerpo antineoplásico distinto del primer anticuerpo.

30 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

ES 2 815 224 T3

SEQ ID NO.	Tipo	Descripción
23	Aminoácido	Péptido tríptico de Adalimumab
24	Aminoácido	Péptido tríptico de Certolizumab
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 por IdeS de Infliximab (VH+CH1)
39	Aminoácido	Péptido proteolítico por IdeS de Infliximab (VL+CL)
40	Aminoácido	Péptido proteolítico por IdeS de Etanercept
41	Aminoácido	Péptido proteolítico por IdeS de Adalimumab (VH+CH1)
42	Aminoácido	Péptido proteolítico por IdeS de Adalimumab (VL+CL)
43	Aminoácido	Péptido proteolítico por IdeS de Certolizumab (VH+CH1)
44	Aminoácido	Péptido proteolítico por IdeS de Certolizumab (VL+CL)
45	Aminoácido	Péptido proteolítico por IdeS de Golimumab (VH+CH1)
46	Aminoácido	Péptido proteolítico por IdeS de Golimumab (VL+CL)
47	Aminoácido	Péptido tríptico de Trastuzumab
48	Aminoácido	Péptido tríptico de Trastuzumab
49	Aminoácido	Péptido tríptico de Trastuzumab
50	Aminoácido	Péptido tríptico de Trastuzumab
51	Aminoácido	Péptido tríptico de Trastuzumab
52	Aminoácido	Péptido tríptico de Trastuzumab
53	Aminoácido	Péptido tríptico de Trastuzumab
54	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab
55	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab
56	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab
57	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab
58	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab
59	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab
60	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab
61	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab
62	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab

SEQ ID NO.	Tipo	Descripción
63	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab
64	Aminoácido	Péptido tríptico de Rituximab
65	Aminoácido	Péptido tríptico de Bevacizumab
66	Aminoácido	Péptido tríptico de Bevacizumab
67	Aminoácido	Péptido tríptico de Bevacizumab
68	Aminoácido	Péptido tríptico de Bevacizumab
69	Aminoácido	Péptido tríptico de Bevacizumab
70	Aminoácido	Péptido tríptico de Bevacizumab
71	Aminoácido	Péptido tríptico de Bevacizumab
72	Aminoácido	Péptido tríptico de Bevacizumab
73	Aminoácido	Infliximab, cadena pesada
74	Aminoácido	Infliximab, cadena ligera
75	Aminoácido	Adalimumab, cadena pesada
76	Aminoácido	Adalimumab, cadena ligera
77	Aminoácido	Etanercept
78	Aminoácido	Certolizumab, cadena pesada
79	Aminoácido	Certolizumab, cadena ligera
80	Aminoácido	Golimumab, cadena pesada
81	Aminoácido	Golimumab, cadena ligera
82	Aminoácido	Trastuzumab, cadena pesada
83	Aminoácido	Trastuzumab, cadena ligera
84	Aminoácido	Rituximab, cadena pesada
85	Aminoácido	Rituximab, cadena ligera
86	Aminoácido	Bevacizumab, cadena pesada
87	Aminoácido	Bevacizumab, cadena ligera

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PROTEÓMICA AVANZADA PROMETEDORA

<120> Un método para cuantificar anticuerpos terapéuticos

5 <130> PR73882

<160> 87

<170> BiSSAP 1.3.2

<210> 1

<211> 16

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Infliximab"

<223> Péptido tríptico de Infliximab

<220>

- <220>
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
- 5 <400> 4
 Ser Ala Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Infliximab"
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
- 15 <220>
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
 <400> 5
 Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
 1 5 10
 <210> 6
- 20 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Infliximab"
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
- 25 <220>
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
 <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
 30 Glu Arg
 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Infliximab"
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
 5 <220>
 <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
 <210> 8
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Infliximab"
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
 15 <220>
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Infliximab
 <400> 8
 Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg
 1 5 10
 20 <210> 9
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <223> "Péptido tríptico de Etanercept"
 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <220>
 30 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <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
 <210> 10
 <211> 13
 35 <212> PRT

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Etanercept"
 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 5 <220>
 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <400> 13
Leu Cys Ala Pro Leu Arg
 10 1 5
 <210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <223> "Péptido tríptico de Etanercept"
 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <220>
 20 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <400> 14
Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg
 1 5 10 15
 <210> 15
 <211> 37
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Etanercept"
 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <220>
 30 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Etanercept
 <400> 15

ES 2 815 224 T3

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

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Adalimumab"

<223> Péptido tríptico de Adalimumab

<220>

<223> Péptido tríptico de Adalimumab

10 <220>

<223> Péptido tríptico de Adalimumab

<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

<210> 17

15 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Adalimumab"

<223> Péptido tríptico de Adalimumab

20 <220>

<223> Péptido tríptico de Adalimumab

<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

25 <210> 18

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <223> "Péptido tríptico de Adalimumab"

<223> Péptido tríptico de Adalimumab

<220>
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab

5 <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
 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Adalimumab"
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab

15 <220>
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
 <400> 19

Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg
1				5	

<210> 20

20 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Adalimumab"
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab

25 <220>
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
 <400> 20

Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
1				5				10			

30 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

- <223> "Péptido tríptico de Adalimumab"
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
- 5 <220> <223> Adalimumab tryptic peptide
 <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
 <223> "Péptido tríptico de Adalimumab"
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
 <220>
- 15 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
 <220>
 <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 | | | | | | | |
- <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Adalimumab"
- 25 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Adalimumab
- 30 <400> 23
- | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |
- <210> 24
 <211> 19
 <212> PRT

- <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Certolizumab"
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <220>
- 5 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <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 | | | | | | | | | | | | | |
- 10 <210> 25
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Certolizumab"
- 15 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
- 20 <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 | | | | | | | | | | | | |
- <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Certolizumab"
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
- 30 <220>
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <400> 26
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|
| --- | --- | | | | | | | | | | | | | | |
| Phe | Thr | Phe | Ser | Leu | Asp | Thr | Ser | Lys | | | | | | | |

1 5
 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Certolizumab"
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <220> <223> Certolizumab tryptic peptide
 <220>
 10 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <400> 27
 Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 18
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Certolizumab"
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <220>
 20 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <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
 Gly Lys
 25 <210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Certolizumab"
 30 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Certolizumab
 35 <400> 29

ES 2 815 224 T3

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

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Certolizumab"

<223> Péptido tríptico de Certolizumab

<220>

<223> Péptido tríptico de Certolizumab

10 <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

<210> 31

15 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Golimumab"

<223> Péptido tríptico de Golimumab

20 <220>

<223> Péptido tríptico de Golimumab

<220>

<223> Péptido tríptico de Golimumab

<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

25

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <223> "Péptido tríptico de Golimumab"

<223> Péptido tríptico de Golimumab

<220>

- <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <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
 5 20
 <210> 33
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <223> "Péptido tríptico de Golimumab"
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <220>
- 15 <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
 <210> 34
 <211> 15
- 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Golimumab"
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <220>
- 25 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <400> 34
 Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 1 5 10 15
- 30 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Golimumab"
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 5 <220>
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <400> 35
Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg
1 5
 <210> 36
 10 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Golimumab"
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 15 <220>
 <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
 20 <210> 37
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <223> "Péptido tríptico de Golimumab"
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <220>
 30 <223> Péptido tríptico de Golimumab
 <400> 37
Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
1 5 10
 <210> 38
 <211> 239

ES 2 815 224 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido proteolítico por IdeS de Infliximab (VH+CH1)"

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

5 <220>

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

<220>

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

<400> 38

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
 10 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

<211> 214

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido proteolítico por IdeS de Infliximab (VL+CL)"

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Infliximab (VL+CL)

<220>

20 <223> Péptido proteolítico por IdeS de Infliximab (VL+CL)

<220>

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Infliximab (VL+CL)

ES 2 815 224 T3

<400> 39

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

<223> "Péptido proteolítico por IdeS de Etanercept"

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Etanercept

<220>

10 <223> Péptido proteolítico por IdeS de Etanercept

<220>

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Etanercept

<400> 40

ES 2 815 224 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

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido proteolítico por IdeS de Adalimumab (VH+CH1)"

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

<220>

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

10 <220>

<223> Péptido proteolítico por 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 2 815 224 T3

```

      50              55              60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65              70              75
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
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

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido proteolítico por IdeS de Adalimumab (VL+CL)"

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Adalimumab (VL+CL)

<220>

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Adalimumab (VL+CL)

10 <220>

<223> Péptido proteolítico por 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 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

```

ES 2 815 224 T3

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> 43

<211> 229

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido proteolítico por IdeS de Certolizumab (VH+CH1)"

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

<220>

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

10 <220>

<223> Péptido proteolítico por 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

<210> 44

15 <211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido proteolítico por IdeS de Certolizumab (VL+CL)"

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Certolizumab (VL+CL)

<220>

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Certolizumab (VL+CL)

<220>

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Certolizumab (VL+CL)

5 <400> 44

```

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

<210> 45

<211> 246

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido proteolítico por IdeS de Golimumab (VH+CH1)"

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

<220>

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

15 <220>

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

<400> 45

ES 2 815 224 T3

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

<210> 46

5 <211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido proteolítico por IdeS de Golimumab (VL+CL)"

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Golimumab (VL+CL)

10 <220>

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Golimumab (VL+CL)

<220>

<223> Péptido proteolítico por IdeS de Golimumab (VL+CL)

<400> 46

ES 2 815 224 T3

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

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Trastuzumab"

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

<220>

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

10 <220>

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

<400> 47

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 1 5 10

<210> 48

15 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Trastuzumab"

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

20 <220>

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

<220>

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

<400> 51

Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 1 5 10 15
 Gly Lys

<210> 52

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Trastuzumab"

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

10 <220>

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

<220>

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

<400> 52

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 53

<211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <223> "Péptido tríptico de Trastuzumab"

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

<220>

<223> Péptido tríptico de Trastuzumab

<220>

25 <223> Péptido tríptico de Trastuzumab

<400> 53

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 1 5 10 15
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe
 20 25 30
 Gly Gln Gly Thr Lys
 35

<210> 54

<211> 19

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Rituximab"

- <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <220>
- 5 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <400> 54
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Pro | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ser | Val | Lys | | | | | | | | | | | | | |
- <210> 55
 <211> 15
- 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Rituximab"
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <220>
- 15 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <400> 55
- | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Ser | Tyr | Asn | Met | His | Trp | Val | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
- 20 <210> 56
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Rituximab"
- 25 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
- 30 <400> 56
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | Ala | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asn | Gly | Asp | Thr | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- Tyr Asn Gln Lys
 20
- <210> 57

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Rituximab"
 5 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 10 <400> 57
Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys
1 5
 <210> 58
 <211> 24
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Rituximab"
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 20 <220>
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <400> 58
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20
 <210> 59
 25 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Rituximab"
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 30 <220>
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Rituximab
 <400> 59

ES 2 815 224 T3

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly
1 5 10 15
Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
20 25

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Rituximab"

<223> Péptido tríptico de Rituximab

<220>

<223> Péptido tríptico de Rituximab

10 <220>

<223> Péptido tríptico de Rituximab

<400> 60

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys

<210> 61

15 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Rituximab"

<223> Péptido tríptico de Rituximab

20 <220>

<223> Péptido tríptico de Rituximab

<220>

<223> Péptido tríptico de Rituximab

<400> 61

25 Val Thr Met Thr Cys Arg
1 5

<210> 62

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <223> "Péptido tríptico de Rituximab"

<223> Péptido tríptico de Rituximab

<220>

<223> Péptido tríptico de Rituximab

<220>

<223> Péptido tríptico de Rituximab

<400> 62

```
Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
1      5      10
Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
20      25      30
Val Pro Val Arg
35
```

5 <210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Rituximab"

10 <223> Péptido tríptico de Rituximab

<220>

<223> Péptido tríptico de Rituximab

<220>

<223> Péptido tríptico de Rituximab

15 <400> 63

```
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
1      5      10      15
```

<210> 64

<211> 26

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Rituximab"

<223> Péptido tríptico de Rituximab

<220>

<223> Péptido tríptico de Rituximab

25 <220>

<223> Péptido tríptico de Rituximab

<400> 64

```
Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser
1      5      10
Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
20      25
```

<210> 65

30 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Bevacizumab"
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 5 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <400> 65
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5 10 15
 Trp Val Arg
 <210> 66
 10 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Bevacizumab"
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 15 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <400> 66
 Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
 20
 <210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <223> "Péptido tríptico de Bevacizumab"
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <220>
 30 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <400> 67
 Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys
 1 5
 <210> 68

- <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Bevacizumab"
- 5 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
- 10 <400> 68
 Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 29
 <212> PRT
- 15 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Bevacizumab"
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
- 20 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <400> 69
 Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 1 5 10 15
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 20 25
 <210> 70
- 25 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> "Péptido tríptico de Bevacizumab"
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
- 30 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <220>
 <223> Péptido tríptico de Bevacizumab
 <400> 70

ES 2 815 224 T3

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 20

<210> 71

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Bevacizumab"

<223> Péptido tríptico de Bevacizumab

<220>

<223> Péptido tríptico de Bevacizumab

10 <220>

<223> Péptido tríptico de Bevacizumab

<400> 71

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 72

15 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Péptido tríptico de Bevacizumab"

<223> Péptido tríptico de Bevacizumab

20 <220>

<223> Péptido tríptico de Bevacizumab

<220>

<223> Péptido tríptico de Bevacizumab

<400> 72

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 1 5 10 15
 25 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr

20

25

30

Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 35 40

<210> 73

<211> 450

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Infliximab, cadena pesada"

<223> Infliximab, cadena pesada

<220>

<223> Infliximab, cadena pesada

<220>

<223> Infliximab, cadena pesada

5 <400> 73

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 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 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

<210> 74

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <223> "Infliximab, cadena ligera"

<223> Infliximab, cadena ligera

<220>

<223> Infliximab, cadena ligera

<220>

10 <223> Infliximab, cadena ligera

<400> 74

```

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> 75

<211> 451

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Adalimumab, cadena pesada"

<223> Adalimumab, cadena pesada

<220>

20 <223> Adalimumab, cadena pesada

<220>

<223> Adalimumab, cadena pesada

<400> 75

ES 2 815 224 T3

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
 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> 76

5 <211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Adalimumab, cadena ligera"

<223> Adalimumab, cadena ligera

<220>

<223> Adalimumab, cadena ligera

<220>

5 <223> Adalimumab, cadena ligera

<400> 76

```

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> 77

<211> 467

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> "Etanercept"

<223> Etanercept

<220>

15 <223> Etanercept

<220>

<223> Etanercept

<400> 77

ES 2 815 224 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
 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> 78

<211> 229

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Certolizumab, cadena pesada"

<223> Certolizumab, cadena pesada

<220>

<223> Certolizumab, cadena pesada

<220>

<223> Certolizumab, cadena pesada

5 <400> 78

```

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

```

<210> 79

<211> 214

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<223> "Certolizumab, cadena ligera"

<223> Certolizumab, cadena ligera

<220>

<223> Certolizumab, cadena ligera

15 <220>

<223> Certolizumab, cadena ligera

<400> 79

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

ES 2 815 224 T3

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> 80

<211> 457

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Golimumab, cadena pesada"

<223> Golimumab, cadena pesada

<220>

<223> Golimumab, cadena pesada

10 <220>

<223> Golimumab, cadena pesada

<400> 80

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

ES 2 815 224 T3

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 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

<210> 81

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Golimumab, cadena ligera"

<223> Golimumab, cadena ligera

<220>

<223> Golimumab, cadena ligera

10 <220>

<223> Golimumab, cadena ligera

<400> 81

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

ES 2 815 224 T3

```

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

```

<210> 82

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Trastuzumab, cadena pesada"

<223> Trastuzumab, cadena pesada

<220>

<223> Trastuzumab, cadena pesada

10 <220>

<223> Trastuzumab, cadena pesada

<400> 82

```

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

```

ES 2 815 224 T3

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 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 Glu Glu Met 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

<210> 83

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Trastuzumab, cadena ligera"

<223> Trastuzumab, cadena ligera

<220>

<223> Trastuzumab, cadena ligera

10 <220>

<223> Trastuzumab, cadena ligera

<400> 83

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

ES 2 815 224 T3

```

      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> 84

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Rituximab, cadena pesada"

<223> Rituximab, cadena pesada

<220>

<223> Rituximab, cadena pesada

10 <220>

<223> Rituximab, cadena pesada

<400> 84

```

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

```

ES 2 815 224 T3

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
 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> 85

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Rituximab, cadena ligera"

<223> Rituximab, cadena ligera

<220>

<223> Rituximab, cadena ligera

10 <220>

<223> Rituximab, cadena ligera

<400> 85

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

ES 2 815 224 T3

195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 86

<211> 453

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Bevacizumab, cadena pesada"

<223> Bevacizumab, cadena pesada

<220>

<223> Bevacizumab, cadena pesada

10 <220>

<223> Bevacizumab, cadena pesada

<400> 86

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 Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg 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 Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 87

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> "Bevacizumab, cadena ligera"

<223> Bevacizumab, cadena ligera

<220>

<223> Bevacizumab, cadena ligera

10 <220>

<223> Bevacizumab, cadena ligera

<400> 87

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 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

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para cuantificar un anticuerpo terapéutico en una muestra de un individuo humano, que comprende las etapas de:
- 5 a) añadir a una muestra de ensayo que puede contener anticuerpos terapéuticos a cuantificar una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos terapéuticos, por lo que se proporciona una muestra preproteólisis,
- b) someter la muestra preproteólisis a una proteólisis enzimática, para proporcionar una muestra de proteólisis que comprende (i) péptidos marcados de proteólisis derivados de los anticuerpos terapéuticos marcados y (ii) péptidos de proteólisis derivados del anticuerpo terapéutico contenido en la muestra de ensayo,
- 10 c) determinar por análisis espectrométrico de masas la relación entre (i) uno o más péptidos marcados de proteólisis seleccionados y (ii) uno o más péptidos de proteólisis correspondientes derivados de dicho anticuerpo terapéutico,
- d) calcular, a partir de la relación determinada en la etapa c), la cantidad de dicho anticuerpo terapéutico en la muestra de ensayo;
- 15 en el que la muestra de ensayo es una muestra de plasma humano o una muestra de suero humano, y los dos o más anticuerpos se seleccionan en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab, Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es de un individuo humano que ha recibido un tratamiento terapéutico con el anticuerpo terapéutico.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los dos o más anticuerpos terapéuticos se seleccionan en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los dos o más anticuerpos terapéuticos se seleccionan en un grupo que consiste en: Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteólisis enzimática se realiza en la etapa b) usando tripsina.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan en un grupo que consiste en:
- para *Infliximab*: péptidos de la SEQ ID NO. 1-8,
 - para *Etanercept*: péptidos de la SEQ ID NO. 9-15,
 - para *Adalimumab*: péptidos de la SEQ ID NO. 16-23,
 - 30 - para *Certolizumab*: péptidos de la SEQ ID NO. 24-30, y
 - para *Golimumab*: péptidos de la SEQ ID NO. 31-37,
 - para *Trastuzumab*: péptidos de la SEQ ID NO. 47-53,
 - para *Rituximab*: péptidos de la SEQ ID NO. 54-64,
 - para *Bevacizumab*: péptidos de la SEQ ID NO. 65-73.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteólisis se realiza en la etapa b) incubando la muestra preproteólisis con una proteasa dirigida a la bisagra seleccionada en un grupo que consiste en 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, glutamil endopeptidasa I (GluV8), estreptopaína (SpeB), trepolisina y enzima degradante de inmunoglobulina de *Streptococcus* (ideS).
- 40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el uno o más péptidos de proteólisis seleccionados se seleccionan en un grupo que consiste en:
- para *Infliximab*: péptidos de la SEQ ID NO. 38-39,
 - para *Etanercept*: péptido de la SEQ IDNO. 40,
 - para *Adalimumab*: péptidos de la SEQ IDNO. 41-42,
 - 45 - para *Certolizumab*: péptidos de la SEQ ID NO. 43-44, y

- para *Golimumab*: péptidos de la SEQ ID NO. 45-46.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la etapa a) comprende las siguientes etapas:

5 a1) añadir a una muestra de ensayo una cantidad conocida de dos o más formas marcadas de dichos anticuerpos terapéuticos seleccionados en un grupo que consiste en Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab y Golimumab, Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab, por lo que se proporciona una muestra preproteólisis no concentrada, y

a2) enriquecer la muestra preproteólisis no concentrada en anticuerpos, por lo que se proporciona una muestra preproteólisis.

10 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que en la etapa a2), la muestra de proteólisis no concentrada se somete a una etapa de reducción de proteínas, preferiblemente a una etapa de reducción de albúmina.

11. El método de acuerdo con 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 usando un sustrato de afinidad en que se inmoviliza una diana de anticuerpo terapéutico.

15 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la muestra de ensayo es una muestra de plasma humano.

13. Un kit para cuantificar anticuerpos terapéuticos, que comprende dos o más anticuerpos terapéuticos marcados isotópicamente estables, seleccionados en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab, Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

20 14. El kit de acuerdo con péptidos de la reivindicación precedente, en el que los dos o más anticuerpos terapéuticos marcados isotópicamente estables se seleccionan en un grupo que consiste en: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab.

15. El kit de acuerdo con la reivindicación 14, en el que los dos o más anticuerpos terapéuticos marcados isotópicamente estables se seleccionan en un grupo que consiste en: Trastuzumab, Rituximab y Bevacizumab.

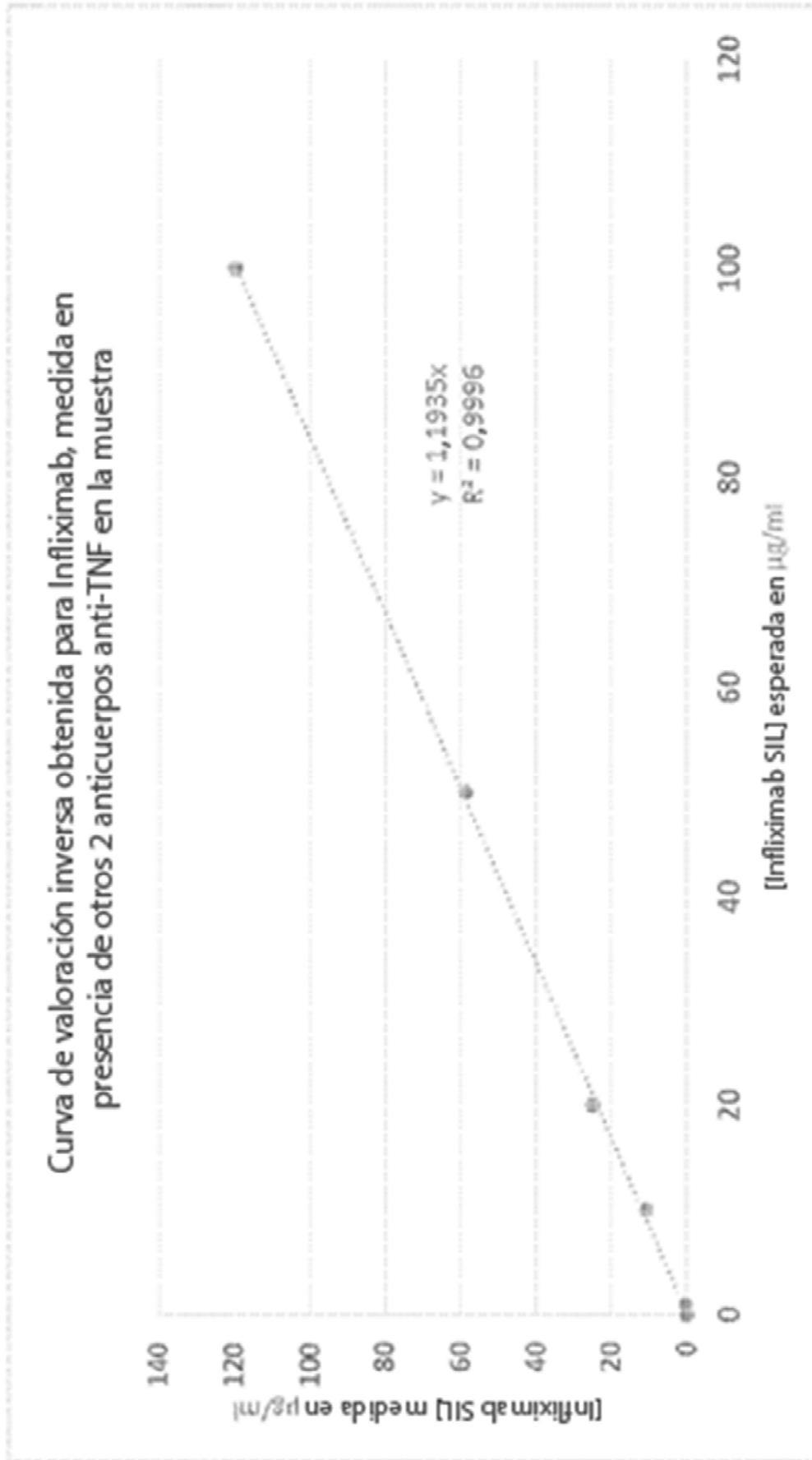


Figura 1

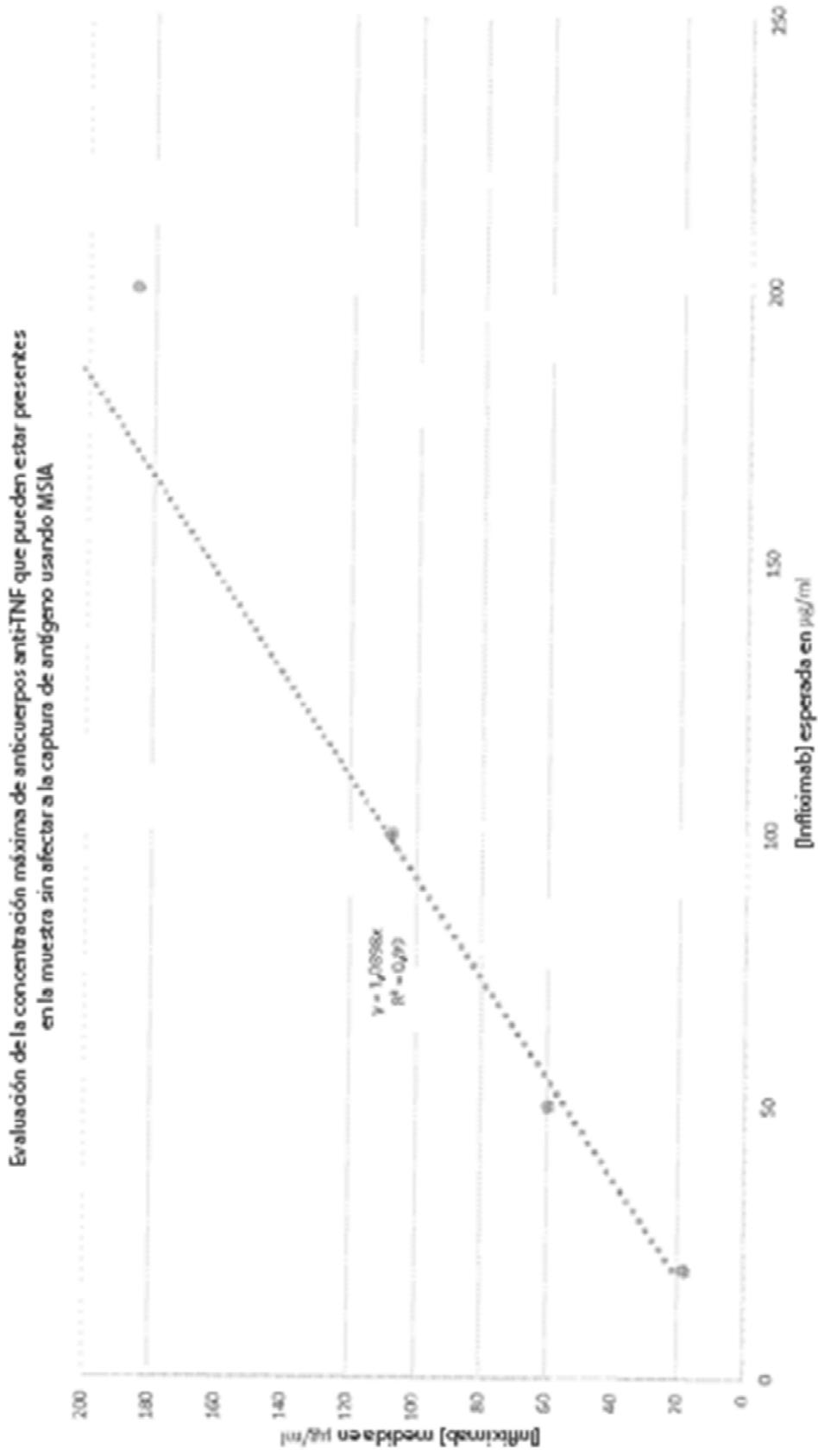


Figura 2

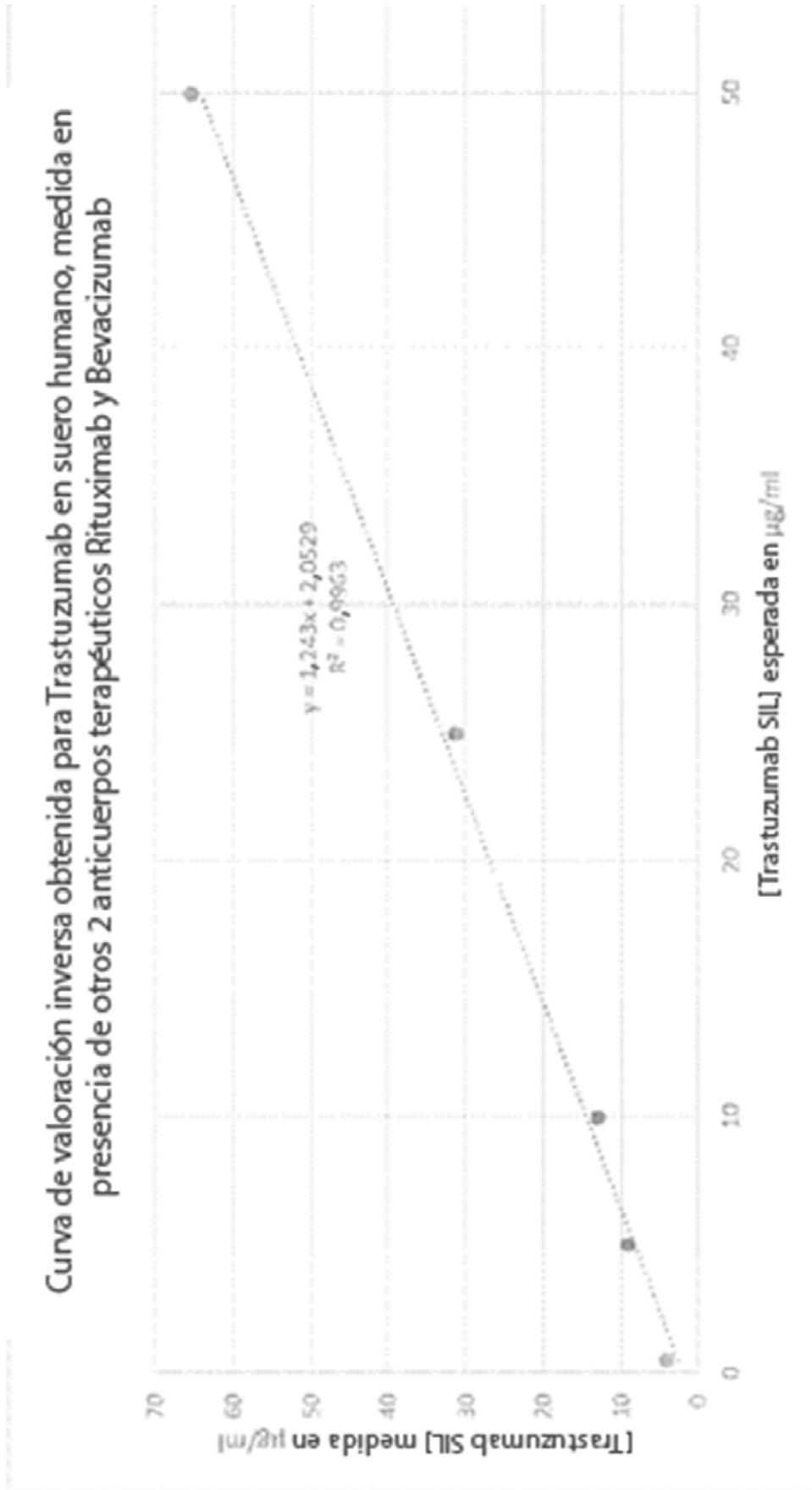


Figura 3