

MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POLIPÉPTIDOS

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reclama el beneficio prioritario de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos de América núm. de Serie 62/617,080, presentada el 12 de enero de 2018, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Presentación de la lista de secuencias en el archivo de texto ASCII

El contenido de la siguiente presentación en el archivo de texto ASCII se incorpora aquí como referencia en su totalidad: un formulario legible por computadora (CRF) del Listado de secuencias (nombre del archivo: 183952028240SEQLIST.txt, fecha de registro: 11 de enero de 2019, tamaño: 29 KB).

Campo de la invención

La presente invención proporciona métodos para cuantificar la cantidad de un polipéptido que comprende una región constante de anticuerpo (o parte del mismo) con una mutación diseñada por ingeniería genética en una muestra.

Antecedentes de la invención

Las proteínas, como los anticuerpos, representan una clase creciente de terapéuticos. Durante el desarrollo preclínico, las proteínas terapéuticas candidatas se someten a análisis exhaustivos en modelos animales para evaluar sus características farmacocinéticas (PK, por sus siglas en inglés), farmacodinámicas (PD, por sus siglas en inglés) y toxicocinéticas (TK, por sus siglas en inglés), para evaluar sus perfiles de seguridad y determinar una dosis segura para primeros estudios en el hombre. Durante el desarrollo clínico, las características PK, PD y TK de las proteínas terapéuticas se analizan adicionalmente en sujetos humanos. Los datos de estudios en humanos se utilizan para evaluar la seguridad y la eficacia de la proteína terapéutica, para establecer programas de dosificación y/o para ajustar las dosis en subpoblaciones de pacientes. Por consiguiente, es crítico que los métodos para cuantificar proteínas terapéuticas tanto en muestras preclínicas como clínicas sean confiables y sensibles.

Los ensayos de unión a ligandos (LBA, por sus siglas en inglés) se han empleado tradicionalmente para la cuantificación de proteínas terapéuticas, debido a su alta sensibilidad, bajo costo y alto rendimiento. A pesar de estas ventajas, los LBA tienen un rango dinámico lineal limitado, conllevan un riesgo de reactividad cruzada entre metabolitos/análogos y son difíciles de multiplexar. Además, el desarrollo de nuevos anticuerpos para su uso en LBA para proteínas terapéuticas novedosas es costoso y laborioso.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) se ha convertido en una plataforma de ensayo prometedora para la cuantificación de proteínas terapéuticas. Los ensayos de LC-MS/MS utilizados para el bioanálisis de proteínas terapéuticas en estudios preclínicos en animales con frecuencia se basan en la cuantificación de un "péptido sustituto" (es decir, un péptido cuya secuencia es única para la proteína terapéutica y ausente en los proteomas de las especies preclínicas)

como medida sustituta de la proteína terapéutica. Debido a que muchas proteínas terapéuticas se derivan de proteínas humanas, la secuencia de un péptido sustituto probablemente estará presente en el proteoma humano, impidiendo así la cuantificación precisa de la proteína terapéutica en una muestra obtenida de un sujeto humano.

5 Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de métodos universales para la cuantificación de proteínas terapéuticas tanto en muestras preclínicas (no humanas) como clínicas (humanas). La presente divulgación está dirigida a esta y otras necesidades.

Todas las referencias citadas en esta solicitud se incorporan expresamente por referencia en este documento.

10

Breve descripción de la invención

Se proporciona un método para cuantificar una cantidad de un polipéptido que comprende una porción de una región constante de cadena pesada de anticuerpo en una muestra, el método comprende: (a) digerir la muestra que comprende el polipéptido que comprende la porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, en donde la porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo comprende una mutación diseñada por ingeniería genética, y en donde la digestión produce un fragmento de péptido derivado de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo que tiene entre 5 y 26 aminoácidos de largo y comprende la mutación diseñada por ingeniería genética; y (b) analizar la muestra digerida por espectrometría de masas para determinar la cantidad del fragmento peptídico, determinando así la cantidad del polipéptido que comprende la porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo en la muestra. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el fragmento de péptido no comprende una metionina (M) o cisteína (C). En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el fragmento de péptido no comprende una asparagina (N) seguida de una glicina (G) o serina (S). En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el método comprende además purificar y concentrar la muestra digerida antes del análisis de espectrometría de masas. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra digerida se purifica y se concentra mediante extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés). En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra digerida se purifica y se concentra a través de SISCAPA (estándares de isótopos estables y captura por anticuerpos antipéptidos).

En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra es una muestra de sangre completa, una muestra de suero, una muestra de plasma o una muestra de tejido. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra es de un ratón, un primate no humano o un humano. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el primate no humano es un mono cynomolgus o un mono rhesus. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra se digiere con al menos una enzima. En

ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la al menos una enzima es tripsina, quimotripsina, glutamil endopeptidasa, lisil endopeptidasa, Asp-N, Arg-C, Glu-C, bromuro de cianógeno (CnBr) o combinaciones de las mismas. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la espectrometría de masas utilizada para determinar la cantidad del polipéptido en la muestra es un análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el polipéptido comprende un dominio CH1, y en donde el dominio CH1 comprende la mutación diseñada por ingeniería genética. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el polipéptido comprende un dominio CH2, y en donde el dominio CH2 comprende la mutación diseñada por ingeniería genética. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el polipéptido comprende un dominio CH3, y en donde el dominio CH3 comprende la mutación diseñada por ingeniería genética. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es T366Y, T366W, T366S, L368A, T394W, T394S, F405A, F405W, Y407T, Y407V o Y407A. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es Y407V, y en donde el dominio CH3 comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6 (DGSFFLVLS). En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la digestión produce un fragmento de péptido que comprende (tal como que consiste en) la secuencia de aminoácidos TTPPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7), DGSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 8), o GSFFLVSKLTVD (SEQ ID NO: 9). En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra se digiere con tripsina, y en donde la digestión produce un fragmento de péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos TTPPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7). En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra se digiere con Asp-N, y en donde la digestión produce un fragmento de péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos DGSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 8). En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra se digiere con Glu-C, y en donde la digestión produce un fragmento de péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos GSFFLVSKLTVD (SEQ ID NO: 9). En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es N434S. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra se digiere con Glu-C y tripsina, y en donde la digestión produce un fragmento de péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos ALHSHYTQK (SEQ ID NO: 11). En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las

modalidades anteriores, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el polipéptido que comprende la porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es un anticuerpo, una proteína de fusión a Fc o una inmunoadhesina. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el polipéptido que comprende la porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es un anticuerpo. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo triespecífico o un anticuerpo multispecífico. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo triespecífico. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo triespecífico comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman tres sitios de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o más blancos de antígeno o proteínas blanco, en donde un primer polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula: VL2-L1-VL1-L2-CL; la segunda cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula: VH1-L3-VH2-L4-CH1-bisagra-CH2-CH3; la tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula: VH3-CH1-bisagra-CH2-CH3; la cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula: VL3-CL, en donde VL1 es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; VL2 es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; VL3 es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; VH1 es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; VH2 es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina, VH3 es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina; CH1 es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina CH1; y L1, L2, L3 y L4 son enlazadores de aminoácidos; en donde el primer y segundo polipéptidos forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada; y en donde la segunda cadena polipeptídica o la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos TTPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7), DGSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 8), o GSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 9). En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID NO: 12; el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 13; el tercer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, y el cuarto polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15.

En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo se conjuga con un fármaco o una etiqueta. En ciertas modalidades de acuerdo

con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el fármaco se selecciona de un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el marcador es un radioisótopo, un colorante fluorescente o una enzima. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo IgG humano. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1 humano o un anticuerpo IgG4 humano. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo se une a A2AR, APRIL, ATPDasa, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4/VTN1, B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CCL4/MIP-1b, CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL8/mcp-2, CCL11/eotaxina, CCL15/MIP-1d, CCL17/TARC, CCL19/MIP-3b, CCL20/MIP-3a, CCL21/MIP-2, CCL24/MPIF-2/eotaxina-2, CCL25/TECK, CCL26/eotaxina-3, CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23/FCER2, CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80/ B7-1, CD86/B7-2, CD122, CD137/41BB, CD137L, CD152/CTLA4, CD154/CD40L, CD160, CD272, CD273/ PDL2, CD274/PDL1, CD275/B7H2, CD276/B7H3, CD278/ ICOS, CD279/PD-1, CDH1/E-cadherina, quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1/M-CSF, CSF-2/GM-CSF, CSF-3/GCSF, CX3CL1/SCYD1, CXCL12/SDF1, CXCL13, CXCR3, DNDR-1, ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GTR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb/IL25, IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4/b4 integrina, ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDasa-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2/receptor para IL33, STEAP2, Syk cinasa, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP/ IL7Ra, TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM o XCR/GPR5/CCXCR1. En ciertas modalidades de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las modalidades anteriores, el método es para uso en el estudio farmacocinético del polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada de anticuerpo en un ratón, un primate no humano y un humano.

Cada modalidad aquí descrita se puede combinar con cualquier otra modalidad o modalidades a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica o modalidad indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características o modalidad o modalidades indicadas como preferidas o ventajosas, a menos que se indique claramente lo contrario. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para un experto en la materia. Estas y otras modalidades de la invención se describen adicionalmente mediante la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra alineamientos de secuencia de las regiones Fc de varios anticuerpos

terapéuticos ejemplares. Los péptidos trípticos predichos que comprenden al menos una sustitución de aminoácidos están subrayados. Las cisteínas presentes en los péptidos trípticos se denotan con flechas gruesas. Las SEQ ID NO: 2 y 5 incluyen la mutación de botón T366W. Las SEQ ID NO: 3 y 4 comprenden las mutaciones de ojal T366S, L368A e Y407V.

5 **Las figuras 2A a 2C** muestran los resultados del análisis LC-MS/MS de un constructo triespecífico digerido trípticamente (TRI-1) que comprende cadenas pesadas con las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOs: 2 y 3. SEQ ID NO: 2 comprende la mutación de "botón" diseñada por ingeniería genética T366W, y la SEC ID NO: 3 comprende mutaciones de "ojal" diseñadas por ingeniería genética T366S, L368A e Y407V. Digestión tríptica de SEQ ID NO: 3 predice que producirá un péptido que
10 tiene la secuencia de aminoácidos TTPPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7), es decir, el "péptido TTPP diseñado por ingeniería genética". **La figura 2A** muestra el cromatograma de iones extraído para m/z 905.40-907.60. **La figura 2B** muestra el cromatograma total de iones. **La figura 2C** muestra el espectro MS/MS del péptido TTPP diseñado por ingeniería genética.

15 **Las figuras 3A a 3D** muestran cromatogramas de iones extraídos de suero de ratón digerido trípticamente (**figura 3A**), suero de mono (**figura 3B**), suero humano (**figura 3C**) y TRI-1 en PBST (**figura 3D**). El tiempo de ejecución para TTPP diseñado por ingeniería genética se indica mediante un cuadro.

Las figuras 4A a 4D muestran cromatogramas de iones extraídos de TRI-1 digerido trípticamente en suero de ratón (**figura 4A**), suero de mono (**figura 4B**), suero humano (**figura 4C**) y PBST (**figura 4D**). El tiempo de ejecución para TTPP diseñado por ingeniería genética se indica mediante un cuadro.

20 **Las figuras 5A a 5C** muestran cromatogramas de iones extraídos de TTPP diseñados por ingeniería genética de TRI-1 digerido trípticamente en PBST, m/z = 905.36-905.55. Las concentraciones de TRI-1 fueron de 20 µg/mL (**figura 5A**), 2 µg/mL (**figura 5B**), y 0.2 µg/mL (**figura 5C**). Las áreas de pico para el péptido TTPP fueron 44064886 (**figura 5A**), 2633166 (**figura 5B**), y 368649 (**figura 5C**).

25 **Las figuras 6A a 6C** muestran cromatogramas de iones extraídos de FNWYVDGVEVHNAK sin marcar (SEQ ID NO: 10) (FNWY) de TRI-1 digerido trípticamente en PBST, m/z = 559.90-559.98. Las concentraciones de TRI-1 fueron de 20 µg/mL (**figura 6A**), 2 µg/mL (**figura 6B**), y 0.2 µg/mL (**figura 6C**). Las áreas de pico para el péptido FNWY fueron 70091279 (**figura 6A**), 1078300 (**figura 6B**), y 209110 (**figura 6C**).

30 **Las figuras 7A a 7C** muestran cromatogramas de iones extraídos de FNWY marcado con isótopos (FNWY (pesado)) de SILUMAB digerido trípticamente utilizado como un estándar interno para la digestión TRI-1 en PBST, m/z = 562.58-562.63. Las concentraciones de TRI-1 fueron de 20 µg/mL (**figura 7A**), 2 µg/mL (**figura 7B**), y 0.2 µg/mL (**figura 7C**). Las áreas de pico para el péptido FNWY fueron 1369078 (**figura 7A**), 343482 (**figura 7B**), y 473743 (**figura 7C**).

35 **Las figuras 8A a 8D** muestran cromatogramas de iones extraídos de TTPP diseñados por ingeniería genética a partir de TRI-1 digerido trípticamente en suero de ratón, m/z = 905.39-905.55. Las concentraciones de TRI-1 fueron de 0 µg/mL (control) (**figura 8A**), 0.2 µg/mL (**figura 8B**), y 2 µg/mL (**figura 8C**), y 20 µg/mL (**figura 8D**). Las áreas de pico para el péptido TTPP fueron ND (no detectado) (**figura 8A**), ND (no detectado) (**figura 8B**), 2168471 (**figura 8C**), y 11833127 (**figura 8D**).

Las figuras 9A a 9D muestran cromatogramas de iones extraídos de FNWY sin marcar de TRI-1 digerido trópticamente en suero de ratón, $m/z = 559.90-559.98$. Las concentraciones de TRI-1 fueron de 0 $\mu\text{g/mL}$ (control) (**figura 9A**), 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 9B**), 2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 9C**), y 20 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 9D**). Las áreas de pico para el péptido FNWY fueron ND (no detectado) (**figura 9A**), 410330 (**figura 9B**), 2500109 (**figura 9C**), y 22039621 (**figura 9D**).

Las figuras 10A a 10D muestran cromatogramas de iones extraídos de FNWY (pesado) de SILUMAB digerido trópticamente utilizado como un estándar interno para la digestión TRI-1 en suero de ratón, $m/z = 562.58-562.63$. Las concentraciones de TRI-1 fueron de 0 $\mu\text{g/mL}$ (control) (**figura 10A**), 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 10B**), 2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 10C**), y 20 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 10D**). Las áreas de pico para el péptido FNWY fueron 1184181 (**figura 10A**), 2310675 (**figura 10B**), 1199642 (**figura 10C**), y 967309 (**figura 10D**).

Las figuras 11A a 11D muestran cromatogramas de iones extraídos de TTPP diseñados por ingeniería genética a partir de TRI-1 digerido trópticamente en suero de mono, $m/z = 905.39-905.55$. Las concentraciones de TRI-1 fueron de 0 $\mu\text{g/mL}$ (control) (**figura 11A**), 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 11B**), 2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 11C**), y 20 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 11D**). Las áreas de pico para el péptido TTPP fueron ND (no detectado) (**figura 11A**), ND (no detectado) (**figura 11B**), 1013964 (**figura 11C**), y 3751017 (**figura 11D**).

Las figuras 12A a 12D muestran cromatogramas de iones extraídos de FNWY sin marcar de TRI-1 digerido trópticamente en suero de mono, $m/z = 559.92-559.95$. Las concentraciones de TRI-1 fueron de 0 $\mu\text{g/mL}$ (control) (**figura 12A**), 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 12B**), 2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 12C**), y 20 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 12D**). Las áreas de pico para el péptido FNWY fueron 75675 (**figura 12A**), 97731 (**figura 12B**), 1298150 (**figura 12C**), y 13378187 (**figura 12D**).

Las figuras 13A a 13D muestran cromatogramas de iones extraídos de FNWY (pesado) de SILUMAB digerido trópticamente utilizado como un estándar interno para la digestión TRI-1 en suero de mono, $m/z = 562.58-562.63$. Las concentraciones de TRI-1 fueron de 0 $\mu\text{g/mL}$ (control) (**figura 13A**), 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 13B**), 2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 13C**), y 20 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 13D**). Las áreas de pico para el péptido FNWY fueron 1446203 (**figura 13A**), 1216254 (**figura 13B**), 1271728 (**figura 13C**), y 1344983 (**figura 13D**).

Las figuras 14A a 14D muestran cromatogramas de iones extraídos de TTPP diseñados por ingeniería genética de TRI-1 digerido trópticamente en suero humano, $m/z = 905.39-905.55$. Las concentraciones de TRI-1 fueron de 0 $\mu\text{g/mL}$ (control) (**figura 14A**), 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 14B**), 2 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 14C**), y 20 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 14D**). Las áreas de pico para el péptido TTPP fueron ND (no detectado) (**figura 14A**), ND (no detectado) (**figura 14B**), 194065 (**figura 14C**), y 1848332 (**figura 14D**).

Las figuras 15A a 15D muestran comparaciones de la relación de área con la concentración de anticuerpos. **La figura 15A** muestra una comparación de la relación de área de TTPP diseñado por ingeniería genética: FNWY (pesado) versus concentración de anticuerpos de TRI-1 en PBST. **La figura 15B** muestra una comparación de la relación de área de FNWY sin marcar:FNWY (pesado) frente a la concentración de anticuerpos de TRI-1 en PBST. **La figura 15C** muestra una comparación de la relación de área de TTPP diseñado por ingeniería genética: FNWY (pesado) versus concentración de anticuerpos de TRI-1 en suero de ratón. **La figura 15D** muestra una comparación de la relación de área de TTPP diseñado por ingeniería genética:FNWY (pesado) frente a la concentración de anticuerpos de TRI-1 en

suero de mono.

La figura 16 muestra las secuencias de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo trispecífico ejemplar cuantificado en el Ejemplo 2. Las secuencias de los péptidos sustitutos cuantificados en el ensayo LC-MS/MS están subrayadas.

5 **La figura 17** muestra un esquema del anticuerpo trispecífico ejemplar y donde las secuencias de los péptidos sustitutos subrayados en la **figura 16** se encuentran en el anticuerpo trispecífico.

La figura 18 proporciona un diagrama de flujo de trabajo ejemplar de un método para cuantificar el anticuerpo trispecífico usando el péptido TTPP.

10 **La figura 19A** muestra un cromatograma ejemplar del péptido TTPP en LLOQ (límite más bajo de cuantificación, 2.5 µg/mL). **La figura 19B** muestra un cromatograma ejemplar de un péptido TTPP marcado con isótopo estable (estándar [¹³C11-¹⁵N2]-LTTPPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 20), que se utilizó como estándar interno en el Ejemplo 3. **La figura 19C** muestra una curva de calibración del péptido TTPP en el rango de 2.5 µg/mL -10,000 µg/mL.

15 **La figura 20A** muestra una curva de calibración de suero analizada mediante análisis de regresión lineal con ponderación 1/x. **La figura 20B** muestra una segunda curva de calibración de suero analizada mediante análisis de regresión lineal con ponderación 1/x. Las muestras utilizadas para construir las curvas en las **figuras 20A y 20B** se obtuvieron de experimentos separados descritos en el Ejemplo 3.

20 **La figura 21A** muestra una comparación de los niveles relativos de anticuerpos trispecíficos detectados midiendo los niveles del péptido TTPP en suero obtenido de ratones a los que se administró anticuerpo trispecífico a través de LC-MS/MS. **La figura 21B** muestra una comparación de los niveles relativos de anticuerpo trispecífico detectado mediante ELISA en suero obtenido de ratones a los que se administró anticuerpo trispecífico.

25 **La figura 22A** muestra los resultados del análisis LC-MS/MS de una muestra blanco de suero de rata. **La figura 22B** muestra el espectro MS/MS de una muestra de suero de rata enriquecida con 5 µg/mL de anticuerpo trispecífico. **La figura 22C** muestra los resultados del análisis LC-MS/MS de una muestra blanco de suero de mono. **La figura 22D** muestra el espectro MS/MS de una muestra de suero de mono enriquecida con 5 µg/mL de anticuerpo trispecífico. **La figura 22E** muestra los resultados del análisis LC-MS/MS de una muestra blanco de suero de mono. **La figura 22F** muestra el espectro MS/MS de una muestra de suero humano enriquecida con 5 µg/mL de anticuerpo trispecífico.

30

Descripción detallada de la invención

Definiciones

35 Como se usa en el presente documento, una "región constante de anticuerpo" se refiere a la región más conservada del anticuerpo, por ejemplo, fuera de los dominios variables. El término puede incluir la región constante de la cadena ligera, es decir, el dominio CL, la región bisagra, así como los dominios constantes de la cadena pesada CH1, CH2, CH3 y, opcionalmente, CH4.

Como se usa en este documento, el término "mutación diseñada por ingeniería genética" se refiere a una mutación creada por diseño humano (es decir, la mutación no se produjo espontáneamente por

causas naturales y/o fue el resultado de una manipulación humana intencional).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" puede referirse a anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpos que comprenden al menos una porción de una región constante de cadena pesada (que incluye, sin limitación, Fab, F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, scFv, o anticuerpos de cadena pesada sencilla), siempre que exhiban la actividad biológica deseada; anticuerpos monoclonales; anticuerpos policlonales; anticuerpos monoespecíficos; anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos triespecíficos); y proteínas similares a anticuerpos.

El término "anticuerpo" típicamente se refiere a complejos heterotetraméricos que incluyen dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H). Un número variable de enlaces disulfuro conecta las dos cadenas pesadas, y uno conecta cada cadena ligera a una cadena pesada, además de los puentes disulfuro intracadena. Las cadenas pesadas incluyen un dominio variable (VH) seguido (N-terminal a C-terminal) por tres o cuatro dominios constantes. Las cadenas ligeras incluyen un dominio variable (VL) seguido de un dominio constante (CL). Por lo general, las cadenas ligeras de mamíferos caen en una de dos categorías basado en la secuencia de aminoácidos: kappa y lambda.

Como se usa en el presente documento, el término "multiespecífico" cuando se usa en referencia a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo incluye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que posee dos o más especificidades de unión diferentes (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y triespecíficos). Por ejemplo, cada especificidad de unión puede reconocer un antígeno diferente, o cada especificidad de unión puede reconocer el mismo antígeno con diferente afinidad y/o epítopo preciso. En algunas modalidades, cada especificidad de unión diferente comprende uno o más dominios de unión de antígeno anticuerpo diferentes (por ejemplo, dominios variables), de modo que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo multiespecífico comprende, por ejemplo, un primer dominio de unión a antígeno con una primera especificidad de unión, un segundo dominio de unión a antígeno con una segunda especificidad de unión, etc. Una variedad de formatos de anticuerpos multiespecíficos ejemplares (por ejemplo, formatos de anticuerpos biespecíficos y triespecíficos) se conocen en la técnica y se describen con más detalle en otra parte del presente documento.

Antes de describir las modalidades descritas en detalle, debe entenderse que la presente divulgación no se limita a composiciones particulares o sistemas biológicos, que pueden, por supuesto, variar. Se debe entender que la terminología utilizada en la presente es para el propósito de describir solo modalidades particulares y no pretende ser limitante.

Como se utiliza en esta especificación y las reivindicaciones anexas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de tales moléculas, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere al rango de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) modalidades que están dirigidas a ese valor o parámetro per se.

Se entiende que los aspectos y modalidades de la presente divulgación incluyen aspectos y modalidades "que comprenden", "que consisten" y "que consisten esencialmente en".

Métodos para cuantificar un polipéptido en una muestra

La espectrometría de masas (MS) es una alternativa factible a los ensayos de unión a ligandos (LBA) para el análisis cuantitativo de proteínas terapéuticas en muestras obtenidas, por ejemplo, de estudios preclínicos en animales. El procedimiento típico para la cuantificación basada en MS implica digerir cada muestra para generar fragmentos de péptidos y cuantificar la cantidad de un péptido específico derivado de la proteína terapéutica como un sustituto de la proteína terapéutica misma. Actualmente, los péptidos sustitutos "universales" derivados de la región constante de un anticuerpo humano se están utilizando en métodos genéricos para la cuantificación de anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos en modelos animales no humanos. Dichos métodos genéricos se basan en el principio de que la secuencia del péptido sustituto "universal" se conserva en todos los dominios Fc humanos, pero está ausente de las especies en las que se realizan estudios preclínicos de eficacia y seguridad (por ejemplo, ratones, ratas, perros, monos, etc.). Sin embargo, no es posible usar péptidos sustitutos "universales" para cuantificar con precisión, por ejemplo, una proteína terapéutica que comprende una región constante de anticuerpos humanos, en muestras de pacientes humanos, ya que la secuencia del péptido sustituto "universal" también está presente en anticuerpos humanos endógenos.

Muchas proteínas terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos) que comprenden una región constante de anticuerpo humano también comprenden mutaciones de ingeniería que se han introducido en la región constante para, por ejemplo, modular la función efectora, modular la vida media del suero, promover la heterodimerización, etc. Los solicitantes descubrieron que los péptidos derivados de la porción de la región constante que contiene una mutación diseñada por ingeniería genética son únicos tanto en el fondo de proteoma humano como en el humano. Por consiguiente, los métodos descritos en este documento pueden usarse para cuantificar proteínas terapéuticas tanto en muestras preclínicas (es decir, obtenidas de especies animales) como en muestras clínicas (es decir, obtenidas de pacientes humanos).

Se proporcionan métodos para cuantificar una cantidad de un polipéptido en una muestra, en donde el polipéptido comprende una porción de una región constante de cadena pesada de anticuerpo, y en donde la porción de la región constante de cadena pesada de anticuerpo comprende una mutación diseñada por ingeniería genética. En algunas modalidades, el método comprende los pasos de: (a) digerir una muestra que se sospecha que comprende el polipéptido para producir una muestra digerida que comprende un fragmento de péptido que comprende la mutación diseñada por ingeniería genética; y (b) analizar la muestra digerida mediante espectrometría de masas para determinar una cantidad del fragmento de péptido que comprende la mutación diseñada por ingeniería genética, determinando así la cantidad del polipéptido. Los polipéptidos que pueden cuantificarse usando los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, proteínas de fusión, inmunoconjugados y anticuerpos) se describen con más detalle en otra parte del presente documento.

En algunas modalidades, los métodos proporcionados en el presente documento se usan en estudios farmacocinéticos (tales como en investigación preclínica o en un ensayo clínico). En algunas

modalidades, los métodos comprenden el paso de administrar el polipéptido que comprende una porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética a un animal, por ejemplo, durante la investigación preclínica, antes de la cuantificación. A continuación se describen en detalle animales no humanos ejemplares a los que se puede administrar el polipéptido que comprende una porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética. En algunas modalidades, los métodos comprenden administrar el polipéptido que comprende una porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética a un humano, por ejemplo, un paciente humano durante un ensayo clínico, antes de la cuantificación.

En algunas modalidades, la muestra que comprende el polipéptido que comprende una porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética es una muestra biológica que se deriva, se obtiene o se separa de un animal. En algunas modalidades, el animal del que se deriva, obtiene o separa la muestra es un animal al que se administró el polipéptido que comprende una porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética. En algunas modalidades, el animal es un mamífero. En algunas modalidades, el mamífero es un humano (por ejemplo, un paciente humano), un primate no humano (NHP) (por ejemplo, un mono cynomolgus, un mono rhesus, un tití, un tamarino, un mono araña, un mico nocturno, un mono ardilla, un cercopiteco verde, un babuino u otros) o un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata).

En algunas modalidades, la muestra a analizar de acuerdo con un método proporcionado en este documento es cualquier muestra que se sospeche que contiene el polipéptido que comprende una porción de una región constante de cadena pesada de anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética. En algunas modalidades, la muestra es o se deriva de un fluido corporal, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, sangre, plasma, suero, leche, lavado bronquial, líquido amniótico, saliva, bilis o lágrimas. En algunas modalidades, la muestra comprende tejido o células. En algunas modalidades, la muestra comprende suero y una cantidad conocida del péptido (es decir, suero "enriquecido"). En algunas modalidades, el suero enriquecido comprende además un amortiguador de pH. En algunas modalidades, el suero enriquecido sirve como referencia para cuantificar la cantidad del polipéptido que comprende una porción de una región constante de cadena pesada de anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética presente en una muestra derivada, obtenida o separada de un animal.

En algunas modalidades, el método comprende además tratar la muestra antes de la digestión para, por ejemplo, enriquecer el polipéptido que comprende una porción de una región constante de cadena pesada de anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética en la muestra, o, por ejemplo, agotar abundantes proteínas de una muestra (como la albúmina de una muestra de sangre, suero o plasma). En algunas modalidades, el tratamiento de la muestra comprende realizar un ensayo de purificación de anticuerpos pull-down. Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, el tratamiento de la muestra comprende realizar electroforesis en gel, extracción, precipitación, centrifugación, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de captura por afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, etc.), ultrafiltración y/o uno o más pasos de separación adicionales conocidos para aquellos de habilidad

ordinaria en la técnica.

En algunas modalidades, la muestra se digiere mediante escisión química. Los reactivos químicos ejemplares que escinden en sitios específicos en polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ácido fórmico, hidroxilamina, ácido iodosobenzoico y NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico). En algunas modalidades, la muestra se digiere con una enzima, por ejemplo, una endopeptidasa. En algunas modalidades, la enzima es una endopeptidasa específica del sitio. Las proteasas específicas de sitio ejemplares incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimotripsina (alta especificidad, escinde c-terminal a FYW, no antes de P), quimotripsina (baja especificidad, escinde c-terminal a FYWML, no antes de P), glutamil endopeptidasa, lisil endopeptidasa, proteasa Asp-N, proteasa Arg-C, proteasa Lys-C, proteasa Lys-N, *Staphylococcus aureus* V8 (también conocido como glutamil endopeptidasa o proteasa Glu-C), bromuro de cianógeno (CnBr), elastasa, pepsina (pH = 1.3), pepsina (pH > 2), neprilisina, BNPS-escatol, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 3, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 6, caspasa 7, caspasa 8, caspasa 9, caspasa 10, clostripaína, enteroinasa, factor Xa, granzima B, termolisina, prolina-endopeptidasa, peptidasa I de *Staphylococcus*, trombina y proteasa del virus del grabado del tabaco. En algunas modalidades, la muestra se digiere con una endopeptidasa no específica, por ejemplo, papaína o proteinasa K. En algunas modalidades, la muestra se digiere con una mezcla que comprende dos (o más) endopeptidasas (incluidas las específicas de sitio y/o no sitio específicas). En algunas modalidades, las dos o más endopeptidasas se usan simultáneamente para digerir la muestra. En algunas modalidades, las dos o más endopeptidasas se usan secuencialmente para digerir la muestra. Los métodos para digerir polipéptidos en preparación para el análisis mediante espectrometría de masas son bien conocidos en la técnica. Se proporcionan métodos ejemplares en, por ejemplo, Gundry et al. (2009) *Curr Protoc Mol Biol.* doi: 10.1002/0471142727.mb1025s88; Hedrick et al. (2015) *Curr Protoc Chem Biol.* 7(3): 201-222; Giansanti et al. (2016) *Nature Protocols.* 11: 993-1006; Nordhoff et al. (*Int J Mass Spect.* 226(1): 163-180; y Zhang et al. (2014) *Curr Protoc Mol Biol.* doi: 10.1002/0471142727.mb1021s108.

La digestión de la muestra produce un fragmento de péptido que comprende la mutación diseñada por ingeniería genética. En algunas modalidades, el fragmento de péptido producido por la digestión tiene una longitud de entre 5 y 40 aminoácidos, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el fragmento peptídico no comprende residuos de cisteína (Cys) y/o metionina (M). Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, el péptido no comprende un residuo de asparagina (N) seguido de un residuo de glicina (G) o un residuo de serina (S) (es decir, NG o NS). En algunas modalidades, el fragmento de péptido no comprende sitios de escisión de endopeptidasa adyacentes, por ejemplo, dos o más sitios de escisión de endopeptidasa específicos de sitio separados por 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos. Se ha desarrollado una variedad de herramientas *in silico* para predecir las poblaciones de péptidos que se pueden producir a través de la digestión (por ejemplo, la digestión con una sola enzima o reactivo de escisión química o una digestión con una combinación de enzimas y/o reactivos de escisión química). Dichas herramientas, que incluyen (sin limitación) PChopper, PeptideCutter, MAPPP, IPEP, MS-Digest y Protein Digestion Simulator, son bien conocidas en la técnica y están disponibles

públicamente, como en la World Wide Web.

En algunas modalidades, el método comprende además purificar y/o concentrar la muestra digerida antes del análisis mediante espectrometría de masas. En algunas modalidades, purificar y/o concentrar la muestra digerida comprende realizar una cromatografía de captura por afinidad o una extracción en fase sólida (SPE), y eluir una muestra purificada y concentrada. (véase, por ejemplo, Gudry et al. (2009) “Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomics Workflow.” *Curr Protoc Mol Biol*. CAPÍTULO: Unidad10.25. doi:10.1002/0471142727.mb1025s88.) En algunas modalidades, purificar y/o concentrar la muestra digerida comprende realizar un patrón de isótopos estables y captura por anticuerpos antipeptidos (SISCAPA). En algunas modalidades, la muestra se somete a un ensayo de extracción de anticuerpos, se digiere (por ejemplo, usando una o más endopeptidasas conocidas en la técnica) y se purifica y/o concentra a través de SISCAPA. Se proporcionan detalles sobre SISCAPA en, por ejemplo, Anderson et al. (2004) “Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA).” *J Proteome Res*. 3(2): 235–44; U.S. Patent Nos. 7,632,686 and 9,164,089; Whiteaker et al. (2011) “Evaluation of large scale quantitative proteomic assay development using peptide affinity-based mass spectrometry.” *Mol Cell Proteomics*. 10(4):M110.005645; and Rasavi et al. (2016) “Multiplexed longitudinal measurement of protein biomarkers in DBS using an automated SISCAPA workflow.” *Bioanalysis*. 8(15):1597-1609.

En algunas modalidades, la muestra digerida se analiza mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). LC-MS/MS es un método en el que una mezcla de muestra se separa primero por cromatografía líquida antes de ionizarse (por ejemplo, mediante ionización por electrospray (ESI, por sus siglas en inglés), ionización química a presión atmosférica (APCI, por sus siglas en inglés) o fotoionización a presión atmosférica (APPI, por sus siglas en inglés)) y caracterizado por una relación masa-carga y abundancia relativa utilizando dos espectrómetros de masas en serie. Se proporcionan detalles sobre LC-MS/MS en, por ejemplo, Grebe et al. (2011) “LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here?” *Clin. Biochem Review*. 32(1): 5–31; El-Khoury et al. “Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory.” *J. Chrom. & Separation Tech*. 4:e115. doi: 10.4172/2157-7064.1000e115; Shushan et al. (2010) “A review of clinical diagnostic applications of liquid chromatography–tandem mass spectrometry.” *Mass Spec. Rev*. 29:930–944, 2010.

En algunas modalidades, los métodos proporcionados aquí pueden usarse para detectar el péptido en una muestra, en donde la concentración del péptido en la muestra es cualquiera de aproximadamente 200, 150, 100, 50, 15, 10, 5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.025 o 0.01 ng/mL, incluido cualquier rango entre estos valores.

Mutaciones diseñadas por ingeniería genética en una región constante de cadena pesada de anticuerpos

En algunas modalidades, el polipéptido cuantificado de acuerdo con un método proporcionado en el presente documento comprende un dominio CH1 (o una porción del mismo, por ejemplo, entre 10 y 50 aminoácidos) que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética. En algunas modalidades, el dominio CH1 se extiende desde aproximadamente el residuo 114 hasta aproximadamente el residuo 223

de la cadena pesada del anticuerpo, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En algunas modalidades, el dominio CH1 se extiende desde aproximadamente el residuo 118 hasta aproximadamente el residuo 215 de la cadena pesada del anticuerpo, de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea. Véase, por ejemplo, International Immunogenetics Information System (IMGT) Recursos web en WorldWideWeb.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html. Estas posiciones de residuos de aminoácidos se basan en IgG humana; sin embargo, no se pretende que los métodos proporcionados en el presente documento se limiten al uso con polipéptidos que comprenden el dominio CH1 (o parte del mismo) de una IgG humana. Las secuencias de dominio CH1 correspondientes de otros lgs humanos, y las secuencias de dominio CH1 correspondientes de otros mamíferos (por ejemplo, macaco, mono cynomolgus, ratón, rata, etc.) están disponibles públicamente.

En ciertas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH1 (o una porción del mismo) comprende (tal como consiste en) una sustitución, inserción o delección de aminoácidos que no afecta (o afecta sustancialmente) la actividad deseada del polipéptido que comprende la región constante de la cadena pesada del anticuerpo. En algunas modalidades, una sustitución o inserción comprende la sustitución o inserción de un aminoácido no natural o un aminoácido conjugado. La sustitución, inserción o delección de aminoácidos se puede introducir en el dominio CH1 (o parte del mismo) alterando el ácido nucleico que codifica el polipéptido (por ejemplo, mediante mutagénesis específica de sitio) o mediante síntesis de péptidos, como se describe con más detalle en otra parte del presente documento.

En ciertas modalidades, el polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en este documento comprende un dominio CH1 de IgG1 humana (o una porción del mismo). En algunas modalidades, la mutación diseñada genéticamente en el dominio CH1 de IgG1 humana (o una porción del mismo) impulsa la heterodimerización de Fc (por ejemplo, para la producción de anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos o anticuerpos de un solo brazo). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH1 de IgG1 humana (o una porción del mismo) es una sustitución de aminoácido en K147 o K213 (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH1 de IgG1 humana comprende (tal como consiste en) la sustitución de aminoácido K147D, K147E, K213D o K213E (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea).

En ciertas modalidades, el polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado aquí comprende un dominio CH2 (o una porción del mismo, por ejemplo, entre 10 y 50 aminoácidos) que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética. En algunas modalidades, el dominio CH2 de una IgG humana se extiende desde aproximadamente el residuo 231 hasta aproximadamente el residuo 340 de la cadena pesada del anticuerpo, de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea. Véase, por ejemplo, International Immunogenetics Information System (IMGT) Recursos web en WorldWideWeb.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html. Estas posiciones de aminoácidos se basan en IgG humana; sin embargo, no se pretende que los métodos proporcionados en el presente documento se limiten al uso con polipéptidos que comprenden el dominio CH2 (o parte del

mismo) de una IgG humana. Las secuencias de dominio CH2 correspondientes de otras Ig humanas están disponibles públicamente, al igual que las secuencias de dominio CH2 correspondientes de otros mamíferos (por ejemplo, macaco, mono cynomolgus, rata, ratón, etc.). En ciertas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 (o parte del mismo) comprende una sustitución, inserción o delección de aminoácidos que no afecta (o afecta sustancialmente) la actividad deseada del polipéptido que comprende la región constante de la cadena pesada del anticuerpo. En algunas modalidades, una sustitución o inserción comprende la sustitución o inserción de un aminoácido no natural o un aminoácido conjugado.

En ciertas modalidades, el polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en este documento comprende un dominio CH2 de IgG1 humana (o una porción del mismo). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG1 humana (o parte del mismo) modula la función efectora. En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG1 humana (o parte del mismo) comprende una sustitución de aminoácido en uno (o más) de los siguientes residuos: E233, L234, L235, G236, P238, S239, F243, T250, M252, S254, T256, P257, S267, R292, Q295, N297, S298, T299, Y300, Q311, K322, A327, L328, P329, A330, P331, I332 y E333 (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG1 humana (o una porción del mismo) comprende una (o más) de las siguientes sustituciones de aminoácidos: E233P, L234V, L234A, L235V, L235A, G236A, P238D, S239D, F243L, T250Q, T250R, M252Y, S254T, T256E, P257I, S267E, R292P, Q295R, N297Q, N297D, N297A, S298G, S298N, S298C, S298A, S28T, T299A, Y300L, Q311I, K322A, A327G, L328E, L328F, L328W, P329G, P329N, A330S, A330L, A330V, P331S, P331V, I332E, I332Y, E333A y E333S (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea). Alternativa o adicionalmente, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG1 humana (o parte del mismo) comprende (tal como consiste en) Δ G236 (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea).

En ciertas modalidades, el polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en este documento comprende un dominio CH2 de IgG2 humana (o una porción del mismo). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG2 humana (o parte del mismo) modula la función efectora. En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG2 humana (o una porción del mismo) comprende una sustitución de aminoácidos en uno (o más) de los siguientes residuos: K326 y E333 (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG1 humana (o una porción del mismo) comprende una (o más) de las siguientes sustituciones de aminoácidos: K326W y E333S (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea).

En ciertas modalidades, el polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en este documento comprende un dominio CH2 de IgG3 humana. En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG3 humana modula la función efectora. En

algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG3 humana comprende una sustitución de aminoácidos en E235 (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea). En algunas modalidades, la sustitución de aminoácidos comprende E235Y.

En ciertas modalidades, el polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en este documento comprende un dominio CH2 de IgG4 humana (o una porción del mismo). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG4 humana (o parte del mismo) modula la función efectora. En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH2 de IgG4 humana (o parte del mismo) comprende una sustitución de aminoácido en uno (o más) de los siguientes residuos: S228, F234, L235, F296, G327 y P329 (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea). En algunas modalidades, la sustitución de aminoácidos comprende una (o más) de las siguientes sustituciones de aminoácidos: S228P, F234A, F234L, L235A, F296Y, G327A, P329G y P329N.

En algunas modalidades, el polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en este documento comprende un dominio CH3 (o una porción del mismo, por ejemplo, entre 10 y 50 aminoácidos) que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética. En algunas modalidades, el dominio CH3 se extiende desde aproximadamente el residuo 341 hasta aproximadamente el residuo 447, de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea. Véase, por ejemplo, International Immunogenetics Information System (IMGT) Recursos web en WorldWideWeb.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html. Estas posiciones de aminoácidos se basan en IgG humana; sin embargo, no se pretende que los métodos proporcionados en el presente documento se limiten al uso con polipéptidos que comprenden el dominio CH3 de una IgG humana. Las secuencias de dominio CH3 correspondientes de otras Ig humanas están disponibles públicamente, al igual que las secuencias de dominio CH3 correspondientes de otras Ig de otros mamíferos (por ejemplo, macaco, mono cynomolgus, rata, ratón, etc.). En ciertas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 (o una porción del mismo) es una sustitución, inserción o delección de aminoácidos que no afecta (o afecta sustancialmente) la actividad deseada del polipéptido que comprende la región constante de la cadena pesada del anticuerpo. En algunas modalidades, una sustitución o inserción comprende la sustitución o inserción de un aminoácido no natural o un aminoácido conjugado.

En ciertas modalidades, el polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en este documento comprende un dominio CH3 de IgG4 humana (o una porción del mismo). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH4 de IgG1 humana (o parte del mismo) modula la función efectora. En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de IgG1 humana (o una porción del mismo) comprende (tal como consiste en) una sustitución de aminoácidos en los residuos R409 (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 IgG1 humana (o parte del mismo) comprende (tal como consiste en) la sustitución de aminoácidos R409K.

En ciertas modalidades, el polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en

este documento comprende un dominio CH3 de IgG1 humana (o una porción del mismo). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de IgG1 humana (o parte del mismo) modula la función efectora y/o mejora la vida media en suero. En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de IgG1 humana (o una porción del mismo) comprende una sustitución de aminoácidos en uno o más) de los siguientes residuos: N343, E380, E382, P396, M428, H433, N434 y Y436 (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de IgG1 humana (o una porción del mismo) comprende una (o más) de las siguientes sustituciones de aminoácidos: N343A, E380A, E382V, P396L, M428I, M428L, H433K, N434S, N434F y Y436H (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de IgG1 humana (o una porción del mismo) impulsa la heterodimerización de Fc (por ejemplo, para la producción de anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos o anticuerpos de un solo brazo). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de IgG1 humana (o parte del mismo) comprende una sustitución de aminoácidos en uno (o más) de los siguientes residuos: Y349, S354, R355, D356, E357, K360, T366, L368, K370, K392, T394, D399, F405, Y407, K409 y K439 (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea). En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de IgG1 humana (o una porción del mismo) comprende una (o más) de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Y349C, S354C, R355D, R355E, D356K, D356R, E357K, E357R, K360D, K360E, T366R, T366K, T366N, T366Q, T366Y, T366W, T366S, T366E, T366G, L368A, L368K, L368Q, L368D, L368E, L368G, L368H, L368I, L368N, L368R, L368S, L368T, L368V, L368W, K370W, K370D, K370E, K392D, K392E, T394W, T394S, D399A, D399G, D399I, D399L, D399M, D399N, D299S, D399T, D399F, D399H, D399K, D399R, D399Y, F405A, F405W, Y407T, Y407V, Y407A, K409R, K409A, K409H, K409D, K409E, K409G, K439D y K439E (de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión Europea).

En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de IgG1 humana (o parte del mismo) comprende (tal como consiste en) Y407V. En algunas modalidades, el polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada de anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 6 (DGSFFLVLS). En algunas modalidades, la digestión de una muestra que comprende (o se sospecha que comprende) un polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada de anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética Y407V produce un fragmento de péptido que comprende (tal como que consiste en) la secuencia de aminoácidos TTPPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7), DGSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 8), o GSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 9). En algunas modalidades, la muestra que comprende (o se sospecha que comprende) un polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada de anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética Y407V se digiere con tripsina, y la digestión produce un fragmento de péptido que comprende (tal como consiste en) la secuencia de aminoácidos TTPPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7). En algunas modalidades, la muestra que comprende (o se sospecha que comprende) un polipéptido que comprende una región

constante de cadena pesada de anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética Y407V se digiere con Asp-N, y la digestión produce un fragmento de péptido que comprende (tal como que consiste en) la secuencia de aminoácidos DGSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 8). En algunas modalidades, la muestra que comprende (o se sospecha que comprende) un polipéptido que comprende una región constante de

5 cadena pesada de anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética Y407V se digiere con Glu-C, y la digestión produce un fragmento de péptido que comprende (tal como que consiste en) la secuencia de aminoácidos GSFFLVSKLTVD (SEQ ID NO: 9).

En algunas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de IgG1 humana comprende (tal como que consiste en) N434S. En algunas modalidades, la muestra que comprende (o

10 se sospecha que comprende) un polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada de anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética N434S se digiere con Glu-C y tripsina, y la digestión produce un fragmento de péptido que comprende (tal como que consiste en) la secuencia de aminoácidos ALHSHYTQK (SEQ ID NO: 11).

En ciertas modalidades, la mutación diseñada por ingeniería genética se introduce en la región

15 constante de la cadena pesada del anticuerpo (o parte de la misma) a través de técnicas estándar de biología molecular conocidas en la técnica. Una variedad de métodos para la ingeniería genética se ha descrito previamente. Dichos métodos de mutagénesis incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, PCR propensa a errores, arrastre de bucles, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Se describen detalles adicionales con respecto a

20 estos métodos, por ejemplo, en Abou-Nadler *et al.* (2010) *Bioengineered Bugs*. 1, 337-340; Firth *et al.* (2005) *Bioinformatics*. 21, 3314-3315; Cirino *et al.* (2003) *Methods Mol Biol*. 231, 3-9; Pirakitikulr (2010) *Protein Sci*. 19, 2336-2346; Steffens *et al.* (2007) *J. Biomol Tech*. 18, 147-149; y otros.

Polipéptidos que comprenden una porción de una región constante de cadena pesada de anticuerpo

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden realizarse usando cualquier

25 polipéptido que comprenda una porción de una región constante de cadena pesada de anticuerpo, en donde la porción de la región constante de cadena pesada de anticuerpo comprende una mutación diseñada por ingeniería genética. En algunas modalidades, el polipéptido comprende todos o una porción (por ejemplo, de 10 a 50 aminoácidos) de un dominio CH1, dominio CH2 y/o dominio CH3, siempre que el dominio o los dominios (o la porción o porciones del mismo) comprendan una mutación diseñada por

30 ingeniería genética (por ejemplo, una mutación diseñada por ingeniería genética descrita en otra parte del presente documento). En algunas modalidades, la porción del dominio constante de la cadena pesada que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética es o se deriva de un mamífero (por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, etc.). En algunas modalidades, la porción de la región constante de la cadena pesada que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética es

35 o se deriva de una IgG humana (como una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), una IgA humana (como una IgA1 o IgA2), una IgM humana, una IgE humana o una IgD humana. En algunas modalidades, la porción de la región constante de la cadena pesada que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética es o se deriva de un ratón (tal como una región constante de cadena pesada de anticuerpo de ratón IgA, IgD,

IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3c o IgM).

En ciertas modalidades, el polipéptido que comprende una porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética es un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de, por ejemplo, una IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana, IgG4 humana, IgA1 humana, IgA2 humana, IgM humana, IgE humana o IgD humana, que comprende al menos una mutación diseñada por ingeniería genética.

En ciertas modalidades, el polipéptido que comprende una porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo con una mutación diseñada por ingeniería genética es un polipéptido de fusión. En algunas modalidades, el polipéptido de fusión es un polipéptido de fusión a Fc, que comprende el dominio Fc (es decir, los dominios CH2 y CH3) de una región constante de cadena pesada de anticuerpo. En algunas modalidades, el polipéptido de fusión es una inmunoadhesina, es decir, un polipéptido de fusión en el que el dominio funcional de una proteína de unión (por ejemplo, un receptor, ligando o polipéptido de adhesión celular) se fusiona a una porción de una región constante de cadena pesada de anticuerpo (típicamente la bisagra y el dominio Fc).

Anticuerpos

En algunas modalidades, el polipéptido que comprende una porción de una región constante de cadena pesada de anticuerpo que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética es un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un complejo heterotetramérico que comprende dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H). En algunas modalidades, las dos cadenas ligeras y las dos cadenas pesadas son idénticas. En algunas modalidades, las dos cadenas ligeras comprenden diferentes secuencias de aminoácidos. En algunas modalidades, las dos cadenas pesadas comprenden diferentes secuencias de aminoácidos. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, que comprende dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa). En alguna modalidad, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que comprende una porción de un dominio constante de cadena pesada que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética, por ejemplo, un Fab, un F(ab')₂, un Fab'-SH, un Fv, un scFv, o un anticuerpo de cadena pesada sencilla. En ciertas modalidades, el anticuerpo es anticuerpo de mamífero (tal como un anticuerpo humano, un anticuerpo de primate no humano, un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de rata, etc.). En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.

Anticuerpos Multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos poseen especificidades de unión contra más de un antígeno (por ejemplo, dos, tres o más de tres especificidades de unión). En algunas modalidades, el anticuerpo cuantificado usando un método proporcionado aquí es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende dos especificidades de unión diferentes para el mismo antígeno (por ejemplo, que tienen diferente afinidad de unión y/o epítipo específico del mismo antígeno). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende especificidades de unión para dos antígenos

diferentes. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa o intacto. Los métodos proporcionados en el presente documento se contemplan para su uso con formatos de anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos conocidos en la técnica. Los ejemplos de formatos de anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, los descritos a continuación.

Por ejemplo, "botones en ojales" es una estrategia de diseño para diseñar por ingeniería genética homodímeros de cadena pesada de anticuerpos para heterodimerización (por ejemplo, para la producción de anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos o anticuerpos de un solo brazo). En general, dicha tecnología implica la introducción de una protuberancia ("botón") en la interfaz de un primer polipéptido (como un primer dominio CH3 en una primera cadena pesada de anticuerpo) y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfaz de un segundo polipéptido (como un segundo dominio CH3 en una segunda cadena pesada de anticuerpo), de modo que la protuberancia se pueda colocar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido (como un primer dominio CH3 en una primera cadena pesada de anticuerpo) con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, arginina, fenilalanina, tirosina o triptófano). Las cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias se crean en la interfaz del segundo polipéptido (como un segundo dominio CH3 en una segunda cadena pesada de anticuerpo) reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina, serina, valina o treonina). Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos núms. 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; 7,642,228; 7,695,936; 8,216,805; y 8,679,785, los contenidos de cada uno de las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Los conjuntos ejemplares de mutaciones de botones en ojales incluyen, entre otros, los que se muestran en la **Tabla 1** a continuación:

Tabla 1. Conjuntos ejemplares de mutaciones de "botones en ojales"

Monómero 1 de dominio Fc	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L368A Y407V	T394W Y407T	T394S Y407A	T366W T394S	S354C T366W	S354C T366W
Monómero 2 de dominio Fc	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A	Y349C T366S L368A Y407V	Y349C T366S L368A Y407A

El documento WO 2011/131746 describe un anticuerpo biespecífico que comprende mutaciones asimétricas en una de las posiciones 366, 368, 370, 399, 405 y 407 (de acuerdo con la numeración de la Unión Europea) en cada dominio CH3. Las mutaciones conducen el intercambio direccional "Fab-arm" o "media-molécula" entre dos anticuerpos mono-específicos IgG1, IgG4 o IgG4 tras la incubación en condiciones reductoras.

US 2009/0232811 y Schaefer *et al.* (2011) *PNAS USA*. 108(27): 11187-11192 describe la tecnología Crossmab, es decir, un formato de anticuerpo biespecífico que implica el intercambio de uno o más dominios de cadena pesada y cadena ligera dentro del fragmento de unión a antígeno (Fab) de una mitad del anticuerpo bi-específico. La asociación correcta de las cadenas ligeras y sus cadenas pesadas

afines se logra mediante el intercambio de dominios de cadena pesada y cadena ligera dentro del fragmento de unión a antígeno (Fab) de una mitad del anticuerpo biespecífico. Este "cruce" retiene la afinidad de unión al antígeno, pero hace que los dos brazos sean tan diferentes que ya no puede producirse un mal emparejamiento de la cadena ligera. Los formatos ejemplares de Crossmab incluyen Crossmab^{Fab} (es decir, en el que los dominios CL y VL se intercambian con los dominios CH1 y VH, respectivamente), Crossmab^{VH-VL} (es decir, en el que se intercambian los dominios VL y VH) y Crossmab^{CH1-VCL} (es decir, en el que se intercambian los dominios CH1 y CL). Véanse también los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253 y WO 2009/080254, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

El documento WO 2007/147901 describe una estrategia para diseñar cadenas pesadas de anticuerpos para la heterodimerización (por ejemplo, para la producción de anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos o anticuerpos de un solo brazo) que implica la introducción de mutaciones asimétricas en los dominios Fc (es decir, K253E, D282K, K322D en un primer dominio Fc y D239K, E240K y K292D en un segundo dominio Fc) y en los dominios CH/CL (es decir, K96E en CH1 y E15K en CL). Se reporta que tales mutaciones asimétricas interrumpen las interacciones iónicas que estabilizan la homodimerización de los semi-anticuerpos y promueven la heterodimerización de los dominios Fc.

El documento WO 2009/089004 describe proteínas heteromultiméricas (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, multiespecíficos o de un solo brazo) que comprenden pares asimétricos de mutaciones en la interfaz CH3-CH3 que hacen que la homodimerización de Fc sea electrostáticamente desfavorable, pero hacen que la heterodimerización de Fc sea electrostáticamente favorable. Véanse, por ejemplo, las tablas 2a y 2b en el documento WO 2009/089004).

Varias proteínas similares a anticuerpos con CODV (variable dual cruzada, por sus siglas en inglés) se describen en Steinmetz *et al.* (2016) *MABS*. 8(5): 867-878, WO 2012/135345, WO2016/116626 y las Patentes de los Estados Unidos núms. 9,181,349 y 9,221,917, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad. La arquitectura CODV da como resultado una estructura circular y autónoma que funciona como una armadura autosuficiente que mantiene las afinidades de anticuerpos parentales para ambos antígenos. Una proteína similar a un anticuerpo CODV puede ser (a) bivalente y/o biespecífica; (b) trivalente y/o triespecífica; (c) trivalente y/o biespecífica; o (d) tetravalente y/o biespecífica. En un formato ejemplar, el polipéptido comprende dos cadenas de polipéptidos que tienen una estructura representada por la fórmula: $V_{L1}-L_1-V_{L2}-L_2-C_L$, y dos cadenas de polipéptidos tienen una estructura representada por la fórmula: $V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-C_{H1}-F_c$, en donde V_{L1} es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; V_{L2} es un segundo dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina; V_{H1} es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; V_{H2} es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina; C_{H1} es el dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina C_{H1} ; F_c comprende una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} , C_{H3} ; L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores de aminoácidos; y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada. En otro formato ejemplar, el polipéptido

comprende dos cadenas de polipéptidos que forman dos sitios de unión a antígeno, en donde el primer polipéptido tiene una estructura representada por la fórmula: $V_{L1}-L_1-V_{L2}-L_2-CL-Fc$, y la segunda cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula: $V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-CH_1-Fc$, en donde: V_{L1} es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; V_{L2} es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; V_{H1} es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; V_{H2} es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina; CH_1 es el dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina CH_1 ; CH_2 es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 ; CH_3 es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina CH_3 ; Fc comprende una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 , CH_3 ; y L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores de aminoácidos; en donde el primer y segundo polipéptidos forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada. En un tercer formato ejemplar, el polipéptido comprende tres cadenas de polipéptidos que forman dos sitios de unión a antígeno, en donde la primera cadena de polipéptidos tiene una estructura representada por la fórmula: $V_{L1}-L_1-V_{L2}-L_2-CL$, la segunda cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula: $V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-CH_1-Fc$, la tercera cadena polipeptídica comprende una región Fc de anticuerpo, en donde: V_{L1} es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; V_{L2} es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; V_{H1} es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; V_{H2} es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina; CH_1 es el dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina CH_1 ; CH_2 es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 ; CH_3 es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina CH_3 ; Fc comprende una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 , CH_3 ; y L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores de aminoácidos; en donde el primer y segundo polipéptidos forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada. En un cuarto formato ejemplar, el polipéptido comprende una primera cadena de polipéptidos que comprende una estructura representada por la fórmula: $V_{L1}-L_1-V_{L2}-L_2-CL$ y una segunda cadena polipeptídica que comprende una estructura representada por la fórmula: $V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-CH_1$ en donde: V_{L1} es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; V_{L2} es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; V_{H1} es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; V_{H2} es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina; CH_1 es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina CH_1 ; y L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores de aminoácidos; en donde el polipéptido de fórmula I y el polipéptido de fórmula II forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada.

Una inmunoglobulina tetravalente biespecífica conocida como inmunoglobulina tándem biespecífica tetravalente (TBTI, por sus siglas en inglés) o inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-Ig, por sus siglas en inglés) se describió por primera vez en Wu *et al.* (2007) *Nat Biotechnol.* 25:1290-7. Al igual que una IgG convencional, una TBTI-DVD-Ig comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Sin embargo, tanto las cadenas pesadas como las ligeras de una TBTI-DVD-Ig comprenden un dominio

variable adicional conectado a través de una secuencia enlazadora flexible y natural en el extremo N del VH y VL de un anticuerpo monoclonal existente. En consecuencia, cuando se combinan las cadenas pesada y ligera, la TBTI-DVD-Ig resultante comprende cuatro sitios de reconocimiento de antígeno. Véanse también las patentes estadounidenses números 9,029,508; 9,109,026; 9,035,027; 9,046,513, 8,388,965; 9,732,162; 9,738,728; Patente Europea núm. 2573121 B1, así como WO2012/135345, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

US 2017/00320967 y WO 2017/180913, cuyos contenidos se incorporan expresamente aquí como referencia en su totalidad, describen una proteína de unión (tal como un anticuerpo trivalente y/o trispecífico) que comprende cuatro cadenas de polipéptidos que forman tres sitios de unión a antígeno.

En algunas modalidades, la proteína de unión es trivalente. En algunas modalidades, la proteína de unión es triespecífica. En un formato ejemplar, la primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula: V_{L2} - L_1 - V_{L1} - L_2 - CL ; la segunda cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula: V_{H1} - L_3 - V_{H2} - L_4 - C_{H1} -bisagra- C_{H2} - C_{H3} ; la tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula: V_{H3} - C_{H1} -bisagra- C_{H2} - C_{H3} ; la cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula: V_{L3} - CL , en donde V_{L1} es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; V_{L2} es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; V_{L3} es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina; V_{H1} es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; V_{H2} es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina, V_{H3} es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina; CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina; C_{H1} es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H1} ; y L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores de aminoácidos; en donde el primer y segundo polipéptidos forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada; y en donde la segunda cadena polipeptídica o la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos TTPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7), DGSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 8), o GSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 9).

En algunas modalidades, los enlazadores L₁, L₂, L₃ y L₄ varían de ningún aminoácido (longitud = 0) a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o menos de 100, 50, 40, 30, 20 o 15 aminoácidos o menos. Los enlazadores también pueden tener 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos de longitud. L₁, L₂, L₃ y L₄ en una proteína de unión, todos pueden tener la misma secuencia de aminoácidos o todos pueden tener diferentes secuencias de aminoácidos.

Los ejemplos de enlazadores adecuados incluyen un solo residuo de glicina (Gly); un péptido de diglicina (Gly-Gly); un tripéptido (Gly-Gly-Gly); un péptido con cuatro residuos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 21); un péptido con cinco residuos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 22); un péptido con seis residuos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 23); un péptido con siete residuos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 24); un péptido con ocho residuos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 25). Se pueden usar otras combinaciones de residuos de aminoácidos, como el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 26), el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 27) y el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-

Ser (SEQ ID NO: 28). Otros enlazadores adecuados incluyen un solo residuo Ser y Val; el dipéptido Arg-Thr, Gln-Pro, Ser-Ser, Thr-Lys y Ser-Leu; Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 29), Thr-Val-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 30), Gln-Pro-Lys-Ala-Ala (SEQ ID NO: 39), Gln-Arg-Ile-Glu-Gly (SEQ ID NO: 31); Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 37), Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser (SEQ ID NO: 32), Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 33), y His-Ile-Asp-Ser-Pro-Asn-Lys (SEQ ID NO: 34). Los ejemplos enumerados anteriormente no pretenden limitar el alcance de la divulgación de ninguna manera, y los enlazadores que comprenden aminoácidos seleccionados al azar seleccionados del grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, glicina y prolina han demostrado ser adecuados en las proteínas de unión.

La identidad y la secuencia de los residuos de aminoácidos en el enlazador pueden variar según el tipo de elemento estructural secundario necesario para lograr en el enlazador. Por ejemplo, la glicina, la serina y la alanina son mejores para los enlazadores que tienen la máxima flexibilidad. Algunas combinaciones de glicina, prolina, treonina y serina son útiles si es necesario un enlazador más rígido y extendido. Cualquier residuo de aminoácido puede considerarse como un enlazador en combinación con otros residuos de aminoácidos para construir enlazadores de péptidos más grandes según sea necesario, dependiendo de las propiedades deseadas.

En algunas modalidades, la longitud de L_1 es al menos dos veces la longitud de L_3 . En algunas modalidades, la longitud de L_2 es al menos dos veces la longitud de L_4 . En algunas modalidades, la longitud de L_1 es al menos dos veces la longitud de L_3 , y la longitud de L_2 es al menos dos veces la longitud de L_4 . En algunas modalidades, L_1 tiene de 3 a 12 residuos de aminoácidos de longitud, L_2 tiene de 3 a 14 residuos de aminoácidos de longitud, L_3 tiene de 1 a 8 residuos de aminoácidos de longitud y L_4 tiene de 1 a 3 residuos de aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1 tiene de 5 a 10 residuos de aminoácidos de longitud, L_2 tiene de 5 a 8 residuos de aminoácidos de longitud, L_3 tiene de 1 a 5 residuos de aminoácidos de longitud y L_4 tiene de 1 a 2 residuos de aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, L_1 tiene 7 residuos de aminoácidos de longitud, L_2 tiene 5 residuos de aminoácidos de longitud, L_3 tiene 1 residuo de aminoácidos de longitud y L_4 tiene 2 residuos de aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, L_1 , L_2 , L_3 , y/o L_4 comprenden la secuencia Asp-Lys-Thr-His-Thr (SEQ ID NO: 35). En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia Asp-Lys-Thr-His-Thr (SEQ ID NO: 35). En algunas modalidades, L_3 comprende la secuencia Asp-Lys-Thr-His-Thr (SEQ ID NO: 35).

En algunas modalidades, L_1 , L_2 , L_3 , y/o L_4 comprenden la secuencia Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 33). En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 33). En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 33), L_2 comprende la secuencia Thr-Lys-Gly-Pro-Ser-Arg (SEQ ID NO: 36), L_3 comprende la secuencia Ser, y L_4 comprende la secuencia Arg-Thr. En algunas modalidades, L_3 comprende la secuencia Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 33). En algunas modalidades, L_1 comprende la secuencia Ser, L_2 comprende la secuencia Arg-Thr, L_3 comprende la secuencia Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 33) y L_4 comprende la secuencia Thr-Lys-Gly-Pro-Ser-Arg (SEQ ID NO: 36).

En algunas modalidades, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos

establecida en SEQ ID NO: 12; el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 13; el tercer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, y el cuarto polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15. (Las SEQ ID NO: 12, 13, 14 y 15 corresponden a SEQ ID NO: 3, 4, 1 y 2 divulgados en el documento WO 2017/074878, respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de anticuerpos triespecíficos ejemplares adicionales se describen en el documento WO 2017/074878, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

La plataforma de dominio diseñado por intercambio de cadena (SEED, por sus siglas en inglés), diseñada para generar moléculas similares a anticuerpos asimétricos y biespecíficos, se basa en el intercambio de secuencias estructuralmente relacionadas de inmunoglobulina dentro de los dominios CH3 conservados. Las secuencias alternas de IgA e IgG humanas en los dominios SEED CH3 generan dos dominios asimétricos pero complementarios, designados AG y GA. El diseño SEED permite la generación eficiente de heterodímeros AG/GA y desfavorece la formación de homodímeros AG/AG y GA/GA. Véase, por ejemplo, Muda *et al.* (2011) *Prot Engineering, Design & Selection*. 24(5): 447-454 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 8,871,912, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Otros formatos de anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos se describen Klein *et al.*, (2012) *mAbs* 4:6, 653-663; Spiess *et al.* (2015) "Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies." *Mol. Immunol.* 67(2 Pt A): 95-106; Egan *et al.* (2017) *mAbs*. 9(1):68-84; Liu *et al.* (2017) *Front Immunol.* 8: 38; y Weidle *et al.* (2013) *Cancer Genomics Proteomics*. 10(1): 1-18.

Antígenos blanco

En ciertas modalidades, un polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en este documento (es decir, un polipéptido que comprende una porción de una región constante de cadena pesada de anticuerpo que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética) se une específicamente a un antígeno blanco. Los antígenos blanco ejemplares incluyen, sin limitación, A2AR, APRIL, ATPDasa, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (también conocido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (también conocido como MCP-1), CCL3 (también conocido como MIP-1a), CCL4 (también conocido como MIP-1b), CCL5 (también conocido como RANTES), CCL7 (también conocido como MCP-3), CCL8 (también conocido como mcp-2), CCL11 (también conocido como eotaxina), CCL15 (también conocido como MIP-1d), CCL17 (también conocido como TARC), CCL19 (también conocido como MIP-3b), CCL20 (también conocido como MIP-3a), CCL21 (también conocido como MIP-2), CCL24 (también conocido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (también conocido como TECK), CCL26 (también conocido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23 (también conocido como FCER2, un receptor para IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80 (también conocido como B7-1), CD86 (también conocido como B7-2), CD122, CD137 (también conocido como 41BB), CD137L, CD152 (también conocido como CTLA4), CD154 (también conocido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (también conocido como PDL2), CD274 (también conocido como PDL1), CD275 (también conocido como B7H2), CD276 (también conocido como B7H3), CD278 (también conocido como ICOS), CD279 (también conocido como PD-1), CDH1 (también conocido como E-

cadherina), quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (también conocido como M-CSF), CSF-2 (también conocido como GM-CSF), CSF-3 (también conocido como GCSF), CX3CL1 (también conocido como SCYD1), CXCL12 (también conocido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GATR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (también conocido como un receptor para IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (también conocido como b4 integrina), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDasa-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (también conocido como un receptor para IL33), STEAP2, Syk cinasa, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNF α , TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (también conocido como un co-receptor para IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, y XCR1 (también conocido como GPR5/CCXCR1). En algunas modalidades, uno o más de los blancos de antígeno anteriores son blancos de antígeno humano. En modalidades en donde el polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada de anticuerpo que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética es una proteína de unión a blanco biespecífica o multiespecífica, los antígenos blanco pueden ser dos (o más) de los antígenos ejemplares enumerados anteriormente.

Conjugados

En algunas modalidades, un polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en este documento (es decir, un polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada de anticuerpo que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética) se conjuga con un fármaco, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma). Los medicamentos ejemplares incluyen, sin limitación, daunomicina, doxorubicina, metotrexato, vindesina, BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo. Las toxinas ejemplares incluyen, sin limitación, cadena A de difteria, fragmentos activos no ligantes de toxina difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), ricina, geldanamicina, maytansina (u otros maytansinoides), auristatinas, dolastatina, calicheamicina, cadena A de abrina, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleuritas fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, tricotecenos y CC1065. Los agentes citotóxicos y los enlazadores que conjugan los agentes con un anticuerpo son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Parslow, A.C. *et al.* (2016) *Biomedicines* 4:14 y Kalim, M. *et al.* (2017) *Drug Des. Devel. Ther.* 11:2265-2276.

En algunas modalidades, un polipéptido a cuantificar de acuerdo con un método proporcionado en el presente documento (es decir, un polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada de anticuerpo que comprende una mutación diseñada por ingeniería genética) se conjuga con una porción detectable que es capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. En ciertas

modalidades, el marcador detectable es un radioisótopo. Una variedad de radioisótopos está disponible para la producción de polipéptidos radioconjugados para su uso en fines clínicos y de investigación. Los ejemplos incluyen ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{32}P , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{131}In , ^{153}Sm , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb e isótopos radiactivos de Lu, Mn, Fe y Gd. En ciertas modalidades, el marcador detectable es un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, como la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa o la peroxidasa de rábano picante.

La descripción escrita anterior se considera suficiente para permitir a un experto en la materia practicar la invención. Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. De hecho, diversas modificaciones, además de las mostradas y descritas en el presente documento, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de un péptido sustituto para usar en un ensayo genérico basado en espectrometría de masas para detectar un polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada de anticuerpo en una muestra

Los siguientes criterios de selección se aplicaron para identificar un péptido sustituto para la detección de un anticuerpo terapéutico en una muestra biológica mediante espectrometría de masas:

- Una longitud entre 6 y 26 aminoácidos;
- No hay sitios de escisión de endopeptidasa adyacentes;
- Sin metionina (M) o cisteína (C) en la secuencia peptídica;
- Sin asparagina seguida de glicina o serina (es decir, NG o NS) en la secuencia peptídica;
- Se deriva de la región constante de una cadena pesada de anticuerpo; y
- Contiene al menos una mutación de sustitución diseñada por ingeniería genética (es decir, excluyendo los polimorfismos naturales).

Primero, se alinearon las secuencias Fc de tres anticuerpos terapéuticos ejemplares. Véase la **figura 1**. SEQ ID NO: 1 es una porción de una cadena pesada de anticuerpo anti-Blanco A. SEQ ID NO: 1 no comprende una mutación diseñada por ingeniería genética. SEQ ID NO: 2 es una porción de una primera cadena (es decir, "cadena 1") de una construcción triespecífica (es decir, "TRI-1"). La cadena 1 de TRI-1 comprende una cadena pesada de anticuerpos que comprende mutaciones S354C y T366W (es decir, mutaciones de "botón") y mutaciones M428L/N434S (que extienden la vida media *in vivo* de TRI-1). SEQ ID NO: 3 es una porción de una segunda cadena (es decir, "cadena 2") de la cadena de TRI-1. La cadena 2 de TRI-1 comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende mutaciones de "ojal" Y349C/T366S/368A/407V y mutaciones M428L/N434S. SEQ ID NO: 4 es una porción de una primera cadena (es decir, "cadena 1") de una segunda construcción triespecífica (es decir, "TRI-2"). La cadena 1 de TRI-2 comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende mutaciones Y349C/T366S/368A/407V (es decir, mutaciones de "ojal") y mutaciones M428L/N434S. SEQ ID NO: 5 es una porción de una segunda cadena (es decir, "cadena 2") de TRI-2. La cadena 2 de TRI-2 comprende una

cadena pesada que comprende mutaciones de "botón" S354C/T366W y mutaciones M428L/N434S. Todas las posiciones de aminoácidos discutidas anteriormente están numeradas de acuerdo con el esquema de numeración de la Unión Europea.

Péptidos candidatos que contienen al menos una mutación de sustitución diseñada por ingeniería genética que se pronostica que resultará de la digestión triptica de las secuencias mostradas en la **figura 1** están subrayados. El péptido TTPPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7), cumplió con todos los criterios enumerados anteriormente.

A continuación, se realizaron búsquedas BLAST utilizando TTPPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7), es decir, el "péptido TTPP diseñado por ingeniería genética", como una secuencia de consulta contra bases de datos de proteínas de ratones, monos cynomolgus y humanos para determinar si dicha secuencia se encuentra en proteínas nativas de estas especies. Las únicas secuencias que exhiben una identidad de aminoácidos del 100 % con el péptido TTPP diseñado por ingeniería genética fueron los anticuerpos de botón en ojal conocidos. Otras secuencias que exhibieron una identidad de aminoácidos del 94 % con el péptido TTPP diseñado correspondieron a dominios Fc humanos que contenían mutaciones de sustitución Y407 distintas de Y407V y dominios Fc humanos endógenos.

Los experimentos descritos a continuación se realizaron para evaluar la viabilidad con la que la digestión con tripsina del constructo triespecífico TRI-1 dio lugar al péptido TTPP diseñado por ingeniería genética. Brevemente, 10 µg de TRI-1 (que comprende SEQ ID NO: 2 y 3 mostradas en la **figura 1**) se digirió usando el Kit de digestión SMART™ (ThermoFisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de digestión se incubó a 70 °C mientras se agitaba a 1400 rpm durante 75 minutos. La muestra digerida se centrifugó a 1000 x g durante 2 minutos, y el sobrenadante se recolectó para purificación y concentración.

El número requerido de pozos en una placa de extracción en fase sólida (SPE) SOLAµ HRP (ThermoFisher) se equilibró con 200 µL de acetonitrilo y luego se acondicionó con 200 µL de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 % en agua. Luego se agregaron a cada pozo 400 µL adicionales de TFA al 0.1 % en agua. Los sobrenadantes de la muestra se agregaron a los pozos y se dejaron pasar. Luego se lavaron los pozos con 500 µL de TFA al 0.1 % en agua y luego se lavaron con 500 µL de ácido fórmico al 0.1 % en agua. Las muestras digeridas se eluyeron con 2 x 25 µL de acetonitrilo al 80 % en agua con ácido fórmico al 0.1 %. El eluido se diluyó con 50 µL de ácido fórmico al 0.1 % en agua y se agitó brevemente a 400 rpm.

Se analizaron 50 µL de cada muestra digerida mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem usando un UPLC Waters H-Class Acquity acoplado a un espectrómetro de masas Thermo QExactive en condiciones típicas de mapeo de péptidos.

Como se muestra en las **figuras 2A a 2C**, la digestión con tripsina de TRI-1 dio lugar de forma reproducible al péptido TTPP diseñado por ingeniería genética, y el péptido se detectó y fragmentó fácilmente. El cromatograma de iones extraídos para m/z de 905.40-907.60, un subconjunto del rango isotópico natural de TTPP diseñado por ingeniería genética se muestra en la **figura 2A**. El TTPP diseñado por ingeniería genética eluyó a los 19 minutos aproximadamente. Dentro del cromatograma de iones totales

(mostrado en la **figura 2B**), el TTPP diseñado por ingeniería genética fue un pico destacado. Además, el TTPP diseñado por ingeniería genética mostró buena fragmentación para el análisis MS/MS (**figura 2C**).

Ejemplo 2: Detección del péptido TTPP en suero

A continuación, se realizó una serie de experimentos para determinar si el péptido TTPP diseñado por ingeniería genética podría detectarse en sueros humanos, de mono y de ratón mediante LC-MS/MS sin interferencia de fondo significativa. Se probaron sueros de ratones y monos cynomolgus, ya que estos animales se usan comúnmente en estudios preclínicos de anticuerpos terapéuticos.

Brevemente, se añadieron 100 μ L de perlas magnéticas de proteína G agitadas (Pierce) y 100 μ L de PBST a los pozos en una microplaca de 96 pozos (Qiagen). La placa se agitó suavemente para asegurar una mezcla homogénea. La placa de 96 pocillos se colocó en un imán Alpaqua 96S Super Magnet de 96 pozos durante un minuto, seguido de un imán Qiagen Tipo A de 96 pozos durante un minuto, y luego se retiró la solución. Este ciclo de lavado se repitió tres veces más con 200 μ L de PBST. Después de completar el lavado, se añadieron 140 μ L de PBST a cada pozo que contenía las perlas. Luego, se añadieron a los pozos 30 μ L de (1) suero de ratón, (2) suero de mono, (3) suero humano o (4) 2 μ g/mL de TRI-1. Se añadieron 30 μ L de los calibradores, control de calidad (QC) y muestras en pozos separados que contenían las perlas, PBST y sueros. La placa de 96 pozos se cubrió y se agitó durante 1 hora a 600 RPM y se lavó cuatro veces. Los calibradores, el control de calidad y las muestras se eluyeron agregando 90 μ L de TFA al 0.1 % en cada pozo y agitando suavemente la placa para asegurar una mezcla homogénea. La placa se colocó en un imán Alpaqua 96S Super Magnet de 96 pozos durante un minuto, seguido de un imán Qiagen Tipo A de 96 pozos durante un minuto. Luego, el eluido se transfirió a una placa Protein LoBind (Eppendorf) de 2.0 mL de pozo profundo de 96 pozos. Luego se repitió el procedimiento de elución. El pH del eluido se neutralizó con 20 μ L de tris-HCl 1 M pH 8, llevando el volumen total a 200 μ L. Brevemente, se añadieron 200 μ L de amortiguador de digestión SMART a cada uno de los eluidos. Las muestras se incubaron a 70 °C con agitación a 400 rpm durante 75 minutos y luego se centrifugaron a 1000 x g durante 2 minutos para formar un pellet de la resina de digestión SMART.

Los pozos en una placa SOLA μ HRP SPE se equilibraron con 200 μ L de acetonitrilo y luego se acondicionaron con 200 μ L de TFA al 0.1 % en agua. Se agregaron a cada pozo 400 μ L adicionales de TFA al 0.1 % en agua. Cada sobrenadante de muestra se añadió a un pozo separado y se dejó pasar. Los pozos se lavaron con 500 μ L de TFA al 0.1 % en agua y luego 500 μ L de ácido fórmico al 0.1 % en agua. Las muestras digeridas se eluyeron con 2 x 25 μ L de acetonitrilo al 80 % en agua con ácido fórmico al 0.1 %. El eluido se diluyó con 50 μ L de ácido fórmico al 0.1 % en agua y se agitó brevemente a 400 rpm.

Las muestras digeridas con SMART fueron analizadas utilizando un UPLC Waters H-Class Acquity y un espectrómetro de masas Thermo QExactive en condiciones estándar de mapeo de péptidos.

Los cromatogramas de iones extraídos para el péptido TTPP diseñado por ingeniería genética (m/z 905.47²⁺) en suero blanco se muestran en las **figuras 3A a 3C**, y el cromatograma de iones extraídos para el péptido TTPP diseñado por ingeniería genética en el digerido de TRI-1 (2 μ g/mL en PBST) se muestra en la **figura 3D**. El pico a los 20.65 min en el digerido de TRI-1 no está presente en ninguno de los fondos de suero probados.

Para confirmar que el péptido TTPP diseñado por ingeniería genética podría detectarse en el fondo del suero, se añadieron muestras de suero humano de ratón, mono y humano con TRI-1 de 20 µg/mL y se sometieron a análisis de extracción de anticuerpos, digestión y espectrometría de masas como se describió anteriormente.

Los cromatogramas de iones extraídos para el péptido TTPP diseñado por ingeniería genética (m/z 905.47²⁺) se muestran en las **figuras 4A a 4C** y el digerido de TRI-1 en PBST se muestra en la **figura 4D**. Al agregar TRI-1 en cada uno de los fondos de suero, el péptido TTPP diseñado por ingeniería genética puede verse claramente en todos los fondos.

Se prepararon diluciones en serie de TRI-1 en el fondo de suero apropiado a concentraciones finales de 0.2, 2 y 20 µg/mL para determinar si la señal aumentaba proporcionalmente a las cantidades de analito en la muestra. Se usaron alícuotas de suero sin aumento de anticuerpos como controles de fondo. La extracción, la digestión, la limpieza de SPE y la LC-MS/MS se realizaron como se describió anteriormente.

Los cromatogramas de iones extraídos de TTPP diseñados por ingeniería genética, FNWY y FNWY (pesado) sin marcar derivados del análisis de las tres concentraciones probadas de TRI-1 (20, 2 y 0.2 µg/mL) en PBST se muestran en las **figuras 5A a 5C, 6A a 6C, y 7A a 7C**, respectivamente. Los cromatogramas de iones extraídos de TTPP diseñados por ingeniería genética, FNWY y FNWY (pesado) sin marcar derivados del análisis de las cuatro concentraciones probadas de TRI-1 (20, 2, 0.2 y 0 µg/mL) en suero de ratón se muestran en las **figuras 8A a 8C, 9A a 9C, y 10A a 10C**, respectivamente. Los cromatogramas de iones extraídos de TTPP diseñados por ingeniería genética, FNWY y FNWY (pesado) sin marcar derivados del análisis de las cuatro concentraciones probadas de TRI-1 (20, 2, 0.2 y 0 µg/mL) en suero de mono se muestran en las **figuras 11A a 11C, 12A a 12C, y 13A a 13C**, respectivamente. Los cromatogramas de iones extraídos de TTPP diseñados por ingeniería genética derivados del análisis de las cuatro concentraciones probadas de TRI-1 (20, 2, 0.2 y 0 µg/mL) en suero humano se muestran en las **figuras 14A a 14C**.

Se determinaron las áreas de pico para el péptido TTPP diseñado por ingeniería genética y el péptido isotópico pesado FNWYVDGVEVHNAK (SEQ ID NO: 10). Véase **la Tabla 2** abajo. FNWY (Pesado) es un estándar interno derivado de la digestión de un anticuerpo monoclonal universal marcado con isótopos estables (SILU™ MAB).

Tabla 2. Resumen de resultados del ensayo de cuantificación

Fondo	TRI-1 Concentraci ón (µg/mL)	TTPP diseñado por ingeniería genética Área de pico	Área de pico de FNWY (pesado)	FNWY (ligero-sin etiqueta) Área de pico	Relación de Área (TTPP diseñado por ingeniería genética: FNWY(pesado))	Relación de Área (FNWY: FNWY(pesado))
PBST	20	44064886	1369078	70091279	32.2	51.2
	2	2633166	343482	1078300	7.7	3.1
	0.2	368649	473743	209110	0.8	0.4
Suero de ratón	20	11833127	967309	22039621	12.2	22.8
	2	2168471	1199642	2500109	1.8	2.1
	0.2	ND	2310675	410330	ND	0.2

Fondo	TRI-1 Concentraci ón (µg/mL)	TTPP diseñado por ingeniería genética Área de pico	Área de pico de FNWY (pesado)	FNWY (ligero-sin etiqueta) Área de pico	Relación de Área (TTPP diseñado por ingeniería genética: FNWY(pesado))	Relación de Área (FNWY: FNWY(pesado))
Suero de mono	20	3751017	1344983	13378187	2.8	9.9
	2	1013964	1271728	1298150	0.8	1.0
	0.2	ND	1216254	97731	ND	0.1
Suero humano	20	1848332		NA		NA
	2	194065		NA		NA
	0.2	ND		NA		NA

Las relaciones de área de TTPP diseñado por ingeniería genética a FNWY (pesado) para PBST, suero de ratón y suero de mono también se muestran en la **Tabla 2** y se representan gráficamente frente a la concentración de TRI-1 de entrada en las **figuras 15A a 15D**. La relación de área de FNWY diseñado por ingeniería genética a FNWY (pesado) para PBST se muestra en la **Tabla 2** y graficado versus la concentración de anticuerpo de entrada en las **figuras 15A, 15C y 15D**.

Los datos anteriores demuestran que hay poca o ninguna interferencia de fondo para el péptido TTPP en suero de ratón, suero de mono o suero humano, y que la señal generada por el péptido TTPP se correlaciona con la cantidad de péptido en una muestra.

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos en los ejemplos 1 y 2

SEQ ID NO.	SECUENCIA
1	THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
2	THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPCRDELTKNQ VSLWCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVLHEAL HSHYTQKSLS LSPG
3	THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSRDELTKNQ VSLSCAVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVLHEAL HSHYTQKSLS LSPG
4	THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSRDELTKNQ VSLSCAVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
5	THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPCRDELTKNQ VSLWCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPG

SEQ ID NO.	SECUENCIA
6	DGSFFLVLS
7	TTPPVLDSDG SFFLVSK
8	DGSFFLVSKL TV
9	GSFFLVSKLT VD
10	FNWYVDGVEV HNAK
11	ALHSHYTQK

Ejemplo 3: Uso del péptido sustituto de TTPP en un ensayo genérico basado en espectrometría de masas para detectar y cuantificar un anticuerpo trispecífico ejemplar.

Panorama general

Los anticuerpos terapéuticos son herramientas atractivas para atacar enfermedades y su mercado está creciendo a un ritmo acelerado. Los ensayos de unión a ligando han sido métodos estándar para medir anticuerpos terapéuticos. Sin embargo, para proporcionar apoyo para su desarrollo, se necesitan nuevas estrategias bioanalíticas. LC-MS/MS representa un método complementario, que proporciona especificidad y mayor reproducibilidad requerida para estudios con Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Además, la LC-MS/MS supera algunas limitaciones asociadas con los ensayos de unión a ligandos (LBA), como la interferencia de la matriz (por ejemplo, componentes en la muestra que pueden impedir la cuantificación precisa del anticuerpo terapéutico) y el desarrollo de reactivos, que pueden ser costosos y consumen mucho tiempo.

Las IgG representan la mayoría de las proteínas terapéuticas actualmente en la clínica. Para reducir la inmunogenicidad, los anticuerpos terapéuticos están diseñados para comprender la región constante de anticuerpos humanos, como las regiones constantes de IgG humana. El desarrollo de un ensayo bioanalítico de LC-MS para cuantificar tales anticuerpos terapéuticos ha sido un desafío, ya que es difícil seleccionar péptidos sustitutos adecuados que puedan usarse para discriminar entre IgG humanas endógenas en una muestra (por ejemplo, una muestra de plasma, suero o sangre) y el anticuerpo terapéutico IgG sin la ayuda de un paso de inmuno-afinidad. Para superar este problema, la región constante de un anticuerpo terapéutico ejemplar se diseñó por ingeniería genética para comprender una mutación de sustitución, por ejemplo, una mutación de sustitución que no se encuentra naturalmente en las regiones constantes de anticuerpos humanos, o en las regiones constantes de anticuerpos de primates no humanos o animales preclínicos (por ejemplo, ratones). Esta estrategia permite una cuantificación precisa del anticuerpo terapéutico en muestras tanto humanas como no humanas sin interferencia de la matriz.

A continuación se describe un ensayo LC-MS/MS libre de extracción por afinidad para una cuantificación rápida y precisa de un anticuerpo trispecífico trivalente contra un blanco soluble en plasma. Al evitar un paso de inmunoafinidad, este método permitirá la cuantificación precisa del fármaco total (suma del fármaco unido al blanco más el fármaco libre). Además, debido a que la mutación de sustitución está en la región constante del anticuerpo, este método puede usarse para cuantificar cualquier proteína terapéutica que comprenda una región constante del anticuerpo.

Procedimiento analítico

Los péptidos sustitutos que se seleccionaron para la cuantificación de un anticuerpo trispecífico ejemplar a través de LC-MS/MS se muestran en las **figuras 16 y 17** y en la **Tabla 4** más adelante. Estos péptidos sustitutos se seleccionaron en función de su respuesta lineal. Se usaron péptidos cuyas secuencias no se encuentran en proteínas humanas o en las proteínas de primates no humanos (es decir, SEQ ID NO: 7, 16 y 38). Para la cuantificación absoluta, se usó el péptido diseñado por ingeniería genética TTPVLDSGDSFFLVSK (SEQ ID NO: 7) (Véanse las **figuras 16 y 17** y la **Tabla 4** más adelante). Para asegurar la integridad del analito, las relaciones entre las áreas bajo los picos de TTPVLDSGDSFFLVSK (SEQ ID NO: 7) y los otros péptidos enumerados en la **Tabla 4** se monitorearon en las muestras que se cuantificaron mediante LC-MS/MS. Las relaciones se mantuvieron constantes en todos los puntos de tiempo (resultados no mostrados).

Tabla 4. Lista de péptidos sustitutos y los parámetros de MS para su detección

Péptido	Transiciones de masa	Energía de colisión (V)
TTPVLDSGDSFFLVSK (SEQ ID NO: 7)	Ion precursor m/z 905.8 → Ion Producto m/z 804.5	37
DTLMISR (SEQ ID NO 18)	Ion precursor m/z 418.2 → Ion Producto m/z 506.3	14
LVIYSGSTR (SEQ ID NO: 16)	Ion precursor m/z 751.9 → Ion Producto m/z 1036.6	21
DSTYSLSSTLTLSK (SEQ ID NO: 17)	Ion Precursor m/z 912.2 → Ion Producto m/z 811.0	30
ESPWTFGQGTK (SEQ ID NO: 38)	Ion precursor m/z 619.3 → Ion Producto m/z 738.4	34

La versión de TTPVLDSGDSFFLVSK etiquetada con isótopos estables (SEQ ID NO: 7) se utilizó como estándar interno (**figura 19B**).

Se desarrolló un flujo de trabajo rápido y robusto para apoyar los estudios preclínicos (véase **figura 18**). El método se basa en el protocolo de digestión de pellets descrito en Ouyang *et al.* (2012) *Bioanalysis*. 4(1), 17–28. Cada paso en el protocolo de digestión se optimizó para maximizar la recuperación del anticuerpo trispecífico de la muestra y la detección de los péptidos sustitutos. (El flujo de trabajo para una muestra de un sujeto humano incluyó un paso de inmunopurificación de proteína A antes del paso de desnaturalización).

El método usó solo 10 μ L de una muestra de plasma. Como un volumen de muestra pequeño era suficiente, el método de cuantificación de péptidos sustitutos es adecuado para medir muestras preclínicas de, por ejemplo, roedores. El tiempo de digestión estándar también se optimizó. La mejor intensidad de señal se observó cuando la muestra se digirió durante dos horas a 37 °C. Para aumentar aún más la sensibilidad del método de cuantificación, las muestras se sometieron a extracción en fase sólida (SPE). La mejor recuperación se obtuvo utilizando cartuchos OASIS MCX.

Validación para plasma de rata

La validación del método se realizó en plasma de rata para apoyar un estudio toxicológico de GLP.

Se eligió un modelo de regresión cuadrática con un coeficiente de regresión medio de 0.979 sobre tres curvas de calibración independientes con tres repeticiones para la corrida y 8 concentraciones nominales (**figura 19A**). La variabilidad del ensayo se evaluó midiendo la exactitud y la precisión de las muestras de control de calidad (QC) en LLOQ (límite más bajo de cuantificación, por sus siglas en inglés), BAJO, MEDIO y ALTO de tres preparaciones independientes. La exactitud y precisión intra/inter corridas se resumen en la **Tabla 5**. El efecto matricial se llevó a cabo utilizando seis lotes de plasma diferentes (véase la **Tabla 6** más adelante). La estabilidad del anticuerpo en plasma se evaluó en plasma humano enriquecido almacenado durante 1-3 y 6 meses a -80 °C y a 37 °C durante 24 h. No se observó degradación durante estos intervalos.

Tabla 5. Exactitud y precisión inter e intra corrida de tres muestras independientes en LLOQ, BAJO, MEDIO y ALTO

Concentración nominal (µg/mL)	Concentración media calculada (µg/mL)	% de Exactitud Diferencia Estimada	Porcentaje de precisión intra-corrida	Porcentaje de precisión inter-corrida
LLOQ 2.5 (n=18)	2.60	4.00	16.2	14.8
QC BAJO 7.5 (n=18)	8.10	7.99	5.57	5.01
QC MEDIO 750 (n=18)	827	10.2	4.17	9.31
QC ALTO 7,500 (n=18)	8220	9.53	2.61	8.63

Tabla 6. Efecto matricial en seis lotes independientes de plasma de rata

Rata 1 (Macho)	Rata 2 (Macho)	Rata 3 (Macho)	Rata 4 (Hembra)	Rata 5 (Hembra)	Rata 6 (Hembra)
Áreas de pico del péptido TTPP (SEQ ID NO: 7) en muestras de plasma blanco					
22	34	48	84	67	50
31	14	25	61	661	11
11	28	17	148	14	56
Área LLOQ (2.5 µg/mL)					
121217	155613	130475	175238	160757	157595
132624	142140	148339	163371	171581	156564
125229	128498	142467	173085	165758	117524
0.637%	4.58%	5.54%	19.9%	1.74%	2.28%
1.30%	14.2%	1.68%	11.2%	10.4%	1.95%
1.42%	3.44%	0.822%	4.67%	2.90%	9.21%

Se realizaron experimentos adicionales para determinar si se podían detectar 5 µg/mL de anticuerpo trispecífico usando el péptido sustituto de TTPP (SEQ ID NO: 7) cuando se agregan en plasma de mono y plasma humano. Como se muestra en las **figuras 22A a 22F**, el péptido TTPP se detectó en el

plasma de rata enriquecido (**figura 22B**), plasma de mono enriquecido (**figura 22D**), y plasma humano enriquecido (**figura 22F**), pero no en plasma de rata blanco (**figura 22A**), plasma de mono blanco (**figura 22C**) o plasma humano blanco (**figura 22E**).

Como se discutió en otra parte en el presente documento, los ensayos de unión a ligandos (LBA), tales como ELISA, se han usado tradicionalmente para detectar y cuantificar proteínas terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) en muestras biológicas. La cuantificación de un anticuerpo monoclonal a través de LBA generalmente implica el uso del antígeno blanco como agente de captura o agente de detección. Sin embargo, los LBA pueden generar resultados inexactos si se usan para detectar anticuerpos trispecíficos y un blanco soluble del anticuerpo trispecífico. Para un anticuerpo trispecífico, la cuantificación a través de LBA implicaría el desarrollo de tres ensayos diferentes (es decir, un ensayo por antígeno blanco), lo que produciría tres conjuntos de datos de concentraciones diferentes, que no sería manejable para especies preclínicas o evaluación de exposición PK humana. Además, sería difícil distinguir la cantidad de anticuerpo libre frente a anticuerpo unido al blanco frente a anticuerpo total en una muestra usando un LBA. En este ejemplo, se demostró que un ensayo genérico de LC-MS, que puede usarse tanto en fase preclínica como clínica, es capaz de medir un anticuerpo trispecífico contra un blanco soluble con alta precisión. Se demostró que el ensayo era específico, como lo demuestra la ausencia de señales interferentes en muestras de plasma blanco (véanse las **figuras 20A a 20F**). También se demostró que este ensayo es reproducible, como se muestra en la **Tabla 5** con una diferencia de porcentaje de exactitud estimado y un porcentaje de precisión inter corridas e intra corridas dentro de los criterios de aceptación reglamentarios internacionales definidos por la FDA y la guía EMA sobre la validación de métodos bioanalíticos (es decir, % de exactitud no mayor de ± 20 % y % de precisión no más de ± 20 %).

Materiales y métodos para especies preclínicas

El anticuerpo trispecífico se proporcionó como una solución madre con una concentración nominal de 25 mg/mL en histidina 10 mM, sacarosa al 8 %, polisorbato 80 al 0.04 %, pH 6.0. El estándar de calibración y los QC se obtuvieron diluyendo la solución madre en plasma de rata.

La digestión de pellets de plasma de rata que contiene anticuerpo trispecífico se optimizó a partir del procedimiento descrito previamente en Ouyang *et al.* (2012) *Bioanalysis*. 4(1), 17–28. Brevemente, se colocaron 10 μ L de cada muestra de plasma de rata que contenía el anticuerpo trispecífico en tubos Lobind de 1.5 mL y se mezclaron con un volumen igual de amortiguador PBS a pH 7.4. Las proteínas plasmáticas y el anticuerpo terapéutico en cada muestra se precipitaron agregando 30 μ L de metanol a los tubos. Después de agitar en vórtex, las muestras se centrifugaron durante 6 minutos a 2000 rcf (fuerza centrífuga relativa) a 5 °C. Los sobrenadantes se descartaron y los pellets de proteína se resuspendieron en 40 μ L de amortiguador de bicarbonato de amonio 200 mM (ABC). Se añadieron 5 μ L de ditiotreitól (DTT) 1 M a cada pellet resuspendido y se incubó a 56 °C durante 30 min con agitación suave. Las muestras se enfriaron luego durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 10 μ L de solución de trabajo estándar interna (100 μ g/mL) a cada muestra y se mezclaron. Las muestras se incubaron adicionalmente con 10 μ L de yodoacetamida (IAA) (100 mM) en amortiguador ABC 100 mM durante 30 minutos bajo rotación suave a temperatura ambiente mientras se protegían de la luz. Se añadieron

30 µg/mL de tripsina y 100 µL de amortiguador ABC a cada muestra, y las muestras se incubaron luego durante 2 horas en rotación suave a temperatura ambiente.

Las reacciones de digestión se detuvieron con 30 µL de ácido fórmico (FA) al 10 % y se centrifugaron durante 10 minutos a 16000 rcf a 5 °C. Los sobrenadantes se sometieron a extracción en fase sólida (SPE) con placas de elución OASIS MCX usando un colector de procesador de presión positiva. Brevemente, las placas se equilibraron con 200 µL de metanol y luego con 200 µL de FA al 0.5 %. Se aplicaron 200 µL de cada sobrenadante sobre las placas y se lavaron con 200 µL de FA al 0.5 %, 200 µL de FA al 0.5 % en solución de MeOH al 80 % y 200 µL de FA al 0.5 % en solución de MeOH al 20 %. Las muestras finalmente se eluyeron con 2x25 µL de amortiguador de hidróxido de amonio al 5 % / metanol (40:60, v/v). Se diluyeron 10 µL de extractos en 200 µL de agua/ácido fórmico (100:0.5, v/v). Se usaron 10 µL de cada muestra eluida para el análisis LC-MS/MS.

El análisis LC-MS/MS se realizó con un espectrómetro de masas SCIEX triple Quadrupole API 5500 con el software ANALYST® versión 1.6.2. El sistema se conectó a un sistema de cromatografía líquida AGILENT 1290 INFINITY. La cromatografía se realizó usando una columna X-Bridge Protein BEH C4; 300 Å (Waters 100 x 2.1 mm ID, tamaño de partícula de 3.5 µm) a 50 ° y un gradiente de solvente A (FA al 0.1 %) y B (FA al 0.1 % en acetonitrilo). Después de equilibrar durante 2.5 minutos con el disolvente A, la solución acuosa se llevó al 55 % después de 5 minutos con un caudal de 600 µL/min.

Los datos de MS se adquirieron en modo positivo con un voltaje de spray de iones de 5500 V, una temperatura de fuente de 600 °C y una temperatura de desolvatación de 60 °C. La energía CE se optimizó para cada péptido (ver **Tabla 4**).

Materiales y métodos para muestras humanas

La purificación por afinidad utilizando la plataforma de manejo de líquidos ASSAYMAP® BRAVO de Agilent se realizó de la siguiente manera: En una placa de 96 pozos, se añadieron sucesivamente 90 µL de PBST y 10 µL de muestra de plasma humano. La placa se agitó con vórtex 5 minutos y se colocó en la posición 4 mantenida a aproximadamente 20 °C en la plataforma ASSAYMAP® BRAVO. La placa de 96 pozos se llenó con 20 µL de Tris 1 M, y los depósitos se llenaron con las siguientes soluciones en orden sucesivo: Cebiar y equilibrar el amortiguador (solución salina amortiguada con fosfato (PBST)), lavado de cartucho 1 (Cartridge Wash 1) (NaCl 1 M en PBST), lavado de cartucho 2 (Cartridge Wash 2) (PBST) y amortiguador de elución y lavado con jeringa (ácido fórmico al 1 %). A continuación, se ejecutó el protocolo de purificación de afinidad en la plataforma de manejo de líquidos ASSAYMAP® BRAVO.

Los pasos de desnaturalización, reducción, alquilación y digestión se realizan de la siguiente manera: La placa de 96 pozos en la posición 9 se centrifugó durante 30 segundos. Se añadieron sucesivamente 50 µL de tensoactivo RAPIGEST™ al 0.2 % en bicarbonato de amonio 50 mM y 20 µL de DL-Ditiotreitol 100 mM en bicarbonato de amonio 100 mM. A continuación, la placa se centrifugó 30 segundos y se incubó a aproximadamente 56 °C durante 30 minutos bajo agitación suave. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente. 20 µL de yodoacetamida 250 mM en bicarbonato de amonio 50 mM y 50 µL de ISW en bicarbonato de amonio 200 mM @ 0.01 % de TWEEN® 20 fue agregado. La placa se centrifugó durante 30 segundos y luego se incubó bajo condiciones de protección contra la luz a

aproximadamente 20 °C durante 30 minutos bajo agitación suave. Se añadieron 100 µL de tripsina fresca a 1 µg/µL en bicarbonato de amonio 50 mM y las muestras se incubaron a aproximadamente 37 °C durante la noche. Luego se añadieron 20 µL de ácido fórmico al 10 % en agua (para detener la digestión).

La extracción en fase sólida utilizando una placa de elución Oasis PRIME MCX se realizó de la siguiente manera: Se aplicaron 200 µL de cada sobrenadante sobre las placas y se lavaron con 200 µL de FA al 0.5 % y 200 µL de FA al 0.5 % en una solución de MeOH al 80 %. Finalmente, las muestras se eluyeron con 50 µL de amortiguador de hidróxido de amonio al 5 % / metanol (40:60, v/v) y se añadieron 150 µL de agua al 0.5 % de ácido fórmico a las muestras eluidas. La placa se cargó en una bandeja de muestreo automático mantenida a +10 °C y se inyectaron 10 µL de cada muestra.

El análisis LC-MS/MS se realizó en las muestras de plasma humano como se describió anteriormente para muestras preclínicas.

Tabla 7. Secuencias de aminoácidos en el ejemplo 3

SEQ ID NO.	SECUENCIA
7	TTPPVLDSDG SFFLVSK
12	EVRLVESGGG LVKPGGSLRL SCSASGDFD NAWMTWVRQP PGKGLEWVGR ITGPGEWGSV DYAESVKGRF TISRDNTKNT LYLEMNNVRT EDTGYFFCAR TGKYDFWSG YPPGEEYFQD WGQGTLVIVS SDKTHTQVHL TQSGPEVRKP GTSVKVSCKA PGNTLKTYDL HWVRSVPGQG LQWMGWISHE GDKKVIVERF KAKVTIDWDR STNTAYLQLS GLTSGDTAVY YCAKGSKHRL RDYALYDDDG ALNWAVDVDY LSNLEFWGQG TAVTVSSDKT HASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPCR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVLHEALHSH YTQKSLSLSP G
13	DFVLTSQSPHS LSVTPGESAS ISCKSSHS LI HGDRNNYLAW YVQKPGRSPQ LLIYLASSRA SGVPDRFSGS GSDKDFTLKI SRVETEDVGT YYCMQGRESP WTFGQGTQVD IKDKHTASE LTQDPAVSA LKQTVTITCR GDSLRSHYAS WYQKKPGQAP VLLFYGKNNR PSGIPDRFSG SASGNRASLT ITGAQAEDEA DYYCSSRDKS GSRLSVFGGG TKLTVLDKTH TRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC
14	QVQLVQSGGQ MKKPGESMRI SCRASGYEFI DCTLNWIRLA PGKRPEWMGW LKPRGGAVNY ARPLQGRVTM TRDVYSDTAF LELRSLTVDD TAVYFCTR GK NCDYNWDFEH WGRGTPVIVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDITLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVCTLPSSRD ELTKNQVSL CAVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPV LDSDGSFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VLHEALHSHY TQKSLSLSPG

SEQ ID NO.	SECUENCIA
15	EIVLTQSPGT LSLSPGETAI ISCRTSQYGS LAWYQQRPGQ APRLVIYSGS TRAAGIPDRF SGSRWGPDYN LTISNLESGD FGVYYCQQYE FFGQGTKVQV DIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
16	LVIYSGSTR
17	DSTYLSSTL TLSK
18	DTLMISR
19	TTPPVLDSDG SFFLYSK
20	LTPPVLDSD GSFFLVSK

Ejemplo 4: Estudios de prueba de concepto para usar el péptido sustituto de TTPP en un ensayo genérico basado en espectrometría de masas para detectar y cuantificar un anticuerpo triespecífico ejemplar después de la administración a ratones

Materiales/métodos

Los materiales utilizados en este ejemplo fueron: anticuerpo triespecífico, suero (ratón), puntas de resina de proteína G (Agilent), puntas de resina C18 (Agilent), estándar interno de anticuerpo monoclonal universal marcado con isótopo estable SILU™ MAB (Sigma), estándar interno de péptido pesado diseñado con ingeniería genética (Thermo), bicarbonato de amonio 50 mM, urea 8 M con Tris base 550 mM, pH 8, cloruro de sodio 1 M en solución salina amortiguada con fosfato, ditiotreitol 125 mM, yodoacetamida 250 mM, solución salina amortiguada con fosfato (PBS), tripsina (Promega), LysC (Promega), agua, ácido acético, ácido trifluoroacético (TFA), ácido fórmico, acetonitrilo.

Preparación de la curva de calibración:

Se preparó una curva de calibración diluyendo en serie el anticuerpo triespecífico en suero de ratón. Las concentraciones probadas en este estudio de prueba de concepto fueron 0.012, 0.024, 0.049, 0.098, 0.195, 0.391, 0.781, 1.563, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0 y 800 µg/mL. Se usó suero sin anticuerpo triespecífico como punto cero.

Preparación de estándar interno marcado con isótopos estables:

En el día de uso, se añadieron 500 µL de ácido fórmico al 0.1 % a un vial de 100 mg de anticuerpo monoclonal universal de marcado con isótopo estable SILU™ MAB (Sigma Aldrich) y se dejó reposar a temperatura ambiente según las instrucciones del fabricante. La concentración del anticuerpo fue de 0.2 µg/µL.

Preparación de estándar interno del péptido pesado diseñado por ingeniería genética marcado:

Se añadieron 2.5 mL de acetonitrilo al 5 % y ácido fórmico al 0.1 % al péptido TTPP liofilizado (49 nmol) para lograr una concentración de 19.6 pmol/µL. El día de uso, la concentración del péptido TTPP se diluyó a 0.08 pmol/µL en acetonitrilo al 40 % con ácido fórmico al 0.1 %.

Ensayo de alto rendimiento para la cuantificación de anticuerpos triespecíficos en suero utilizando una plataforma automatizada de manejo de líquidos (Agilent BRAVO™)

Purificación de afinidad

Para cada muestra de curva de calibración o la muestra de suero a analizar, se añadieron 10 µL de cada muestra a pozos separados en una microplaca de 96 pozos. A continuación, se agregaron a cada pozo 10 µL de suero de ratón adicional y 30 µL de estándar interno de anticuerpo monoclonal universal marcado con isótopo estable a 0.2 µg/µL. La placa de 96 pozos se colocó en la cubierta de la plataforma automatizada de manejo de líquidos (Agilent BRAVO™), y se corrió un protocolo de purificación por afinidad que incluía los siguientes pasos:

1. Lavado inicial de jeringas
2. Cebado (100 µL de PBS a 300 µL/min)
3. Equilibrado (50 µL de PBS a 10 µL/min)
4. Carga de muestra (20 µL a 5 µL/min)
5. Lavado de copa 1 (25 µL de agua desionizada)
6. Lavado interno de cartuchos 1 (50 µL de NaCl 1 M en PBS a 10 µL/min)
7. Lavado de copa 2 (25 µL de agua desionizada)
8. Lavado interno de cartuchos 2 (50 µL de PBS a 10 µL/min)
9. Lavado de jeringa riguroso (50 µL de ácido acético al 5 %)
10. Eluir (10 µL de ácido acético al 5 % a 5 µL/min)

Digestión:

La placa de 96 pozos que contenía las muestras eluidas se colocó en la cubierta de la plataforma automatizada de manejo de líquidos (Agilent BRAVO™) y se realizó un protocolo de digestión que incluía los siguientes pasos:

1. Transferir 40 µL de urea 8 M con Tris 550 mM pH 8 a cada pozo.
2. Transferir 4.3 µL de DTT 125 mM a los pozos y luego incubar a 40 °C durante 60 minutos.
3. Transferir 4.7 µL de IAM 250 mM a los pozos y luego incubar a 25 °C durante 60 minutos.
4. Transferir 111 µL de bicarbonato de amonio 50 mM a cada pozo.
5. Transferir 20 µL de tripsina a 0.5 µg/µL (1:10 enzima:sustrato) y rLysC a 0.2 µg/µL (1:25 enzima:sustrato) a cada pozo e incubar a 37 °C durante 120 minutos.
6. Transferir 20 µL de TFA al 10 % a cada pozo.
7. Transferir 30 µL de péptido diseñado genéticamente marcado a 0.08 pmol/µL (estándar interno del péptido) a cada pozo.

Limpieza C18:

La placa que contenía las muestras digeridas se colocó en la cubierta del sistema Agilent Bravo y se corrió el protocolo "Limpieza de péptidos" que consta de los siguientes pasos:

1. Lavado inicial de jeringas
2. Cebado (acetonitrilo al 60 % con TFA al 0.1 %)
3. Equilibrado (50 µL de TFA a 0.1 % a 25 µL/min)
4. Carga de muestras (190 µL a 5 µL/min)
5. Lavado de copa (50 µL de agua desionizada)
6. Lavado interno de cartuchos (50 µL de TFA a 0.1 % a 25 µL/min)

7. Lavado de jeringa riguroso (50 µL de acetonitrilo al 60 % con TFA al 0.1 %)

8. Eluir (20 µL de acetonitrilo al 60 % con TFA al 0.1 % a 5 µL/min)

LC-MS/MS:

Cada muestra eluida (20 µL en acetonitrilo al 60 % con TFA al 0.1 %) se diluyó rápidamente a 100 µL con una solución de acetonitrilo al 35 % y ácido fórmico al 0.1 % para obtener acetonitrilo al 40 % y ácido fórmico al 0.1 %. Cada muestra se transfirió a un vial de LC-MS individual y se analizó en un sistema LC-MS/MS. El tiempo de retención, la masa parental, las transiciones y las condiciones de fragmentación optimizadas varían según la secuencia de péptidos y el instrumento utilizado para el análisis. El péptido TTPP (TTPPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7)) se analizó en un sistema de cromatografía líquida WATERS® ACQUITY UPLC® Clase I acoplado a un sistema SCIEX QTRAP® 6500 LC-MS/MS en las siguientes condiciones:

Columna: Waters Acquity UPLC Peptide BEH C18 (2.1 x 150 mm, 1.7 µm)

Temperatura de columna: 30 °C

Gradiente de inyección de muestra: Comenzar el gradiente y mantener a 5 % de B durante 1 minuto. Aumentar a 40 % de B en 17 minutos. El caudal es de 0.25 mL/min. Aumentar el caudal a 0.4 mL/min y 90 % de B para inyección de blanco.

Gradiente de inyección de blanco: Comenzar el gradiente y mantener al 90 % de B durante 5 minutos. El caudal es de 0.4 mL/min. Disminuir caudal a 0.25 mL/min y 5 % de B y mantener durante 3 minutos.

Fases móviles: A es agua con ácido fórmico al 0.1 %; B es acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 %

Tiempo de retención 12.9 minutos

Tabla 8. Configuraciones de espectrometría de masas

	Masa Q1	Masa Q3	Potencial de reducción	Energía de colisión	Potencial de entrada	Potencial de salida de celda de colisión
Péptido ligero	905.5	804.4	64	39	10	16
Péptido pesado	909.5	808.4	64	40	13	16

Para este ejemplo, las muestras de curva de calibración y 6 muestras de suero se analizaron en 2 días diferentes. Los ratones se dosificaron dos veces por semana mediante inyección intraperitoneal de anticuerpo triespecífico para un total de 7 dosis. Las muestras de estudio analizadas por LC-MS/MS se recolectaron en el sacrificio (aproximadamente 30 horas después de la última dosis) e incluyeron un animal control dosificado con solución salina (es decir, Ratón 6 en las **Figuras 21A y 21B**) y 5 ratones dosificados con 30 mg/kg del anticuerpo triespecífico (es decir, ratones 1 a 5 en las **figuras 21A y 21B**).

Después de LC-MS/MS, cada curva de calibración de suero se analizó mediante análisis de regresión lineal con ponderación 1/x trazando la relación del péptido TTPP con su estándar interno de péptido marcado pesado frente a la concentración teórica. **Las figuras 20A y 20B** muestran los resultados

de este análisis. Ambas curvas séricas demostraron una buena linealidad (con r -cuadrado ≥ 0.99) y sesgo ($\leq 25\%$) para concentraciones que van desde 0.012 $\mu\text{g/mL}$ a 800 $\mu\text{g/mL}$.

Como se muestra en la **figura 21A**, las muestras de suero mostraron niveles más altos del péptido trispecífico en la mayoría de los ratones a los que se les administró el anticuerpo trispecífico (#1 a 5) y niveles más bajos en el ratón a la solución salina (#6). Los niveles de péptidos detectados en el ensayo basado en LC-MS/MS fueron consistentes entre los 2 ensayos (**figura 21A**). Estas muestras también se analizaron usando ELISA ($n=4$ repeticiones), y los resultados del análisis ELISA se muestran en la **figura 21B**. Los niveles relativos de anticuerpos trispecíficos detectados por LC-MS/MS o ELISA muestran una tendencia constante para todas las muestras.

Si bien la divulgación incluye diversas modalidades, se entiende que los expertos en la materia tendrán variaciones y modificaciones. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas esas variaciones equivalentes que entran dentro del alcance de la divulgación. Además, los encabezados de sección utilizados en este documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito.

Todas las referencias citadas en esta solicitud se incorporan expresamente por referencia en este documento.

SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 5	Bisagra	THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV
		THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV
		THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV
		THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV
		THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV
SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 5	par Cys diseñado por ingeniería genética	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ
		EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ
		EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ
		EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ
		EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ
SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 5	Aumento de la vida media	PREPQVYTLP	PSRDELTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
		PREPQVYTLP	PCRDELTKNQ	VSLMCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
		PREPQVCTLP	PSRDELTKNQ	VSLSCAVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
		PREPQVCTLP	PSRDELTKNQ	VSLSCAVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
		PREPQVYTLP	PCRDELTKNQ	VSLMCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 5		SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCVMHEAL	HNHYTQKSLS	LSPGK	
		SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCSVLHEAL	HSHTQKSLS	LSPG	
		SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCSVLHEAL	HSHTQKSLS	LSPG	
		SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCVMHEAL	HNHYTQKSLS	LSPGK	
		SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCVMHEAL	HNHYTQKSLS	LSPG	

FIG. 1

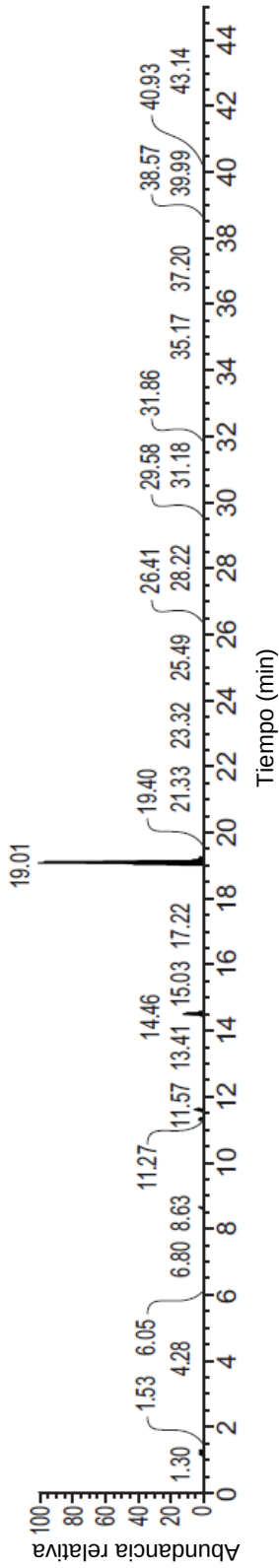


FIG. 2A

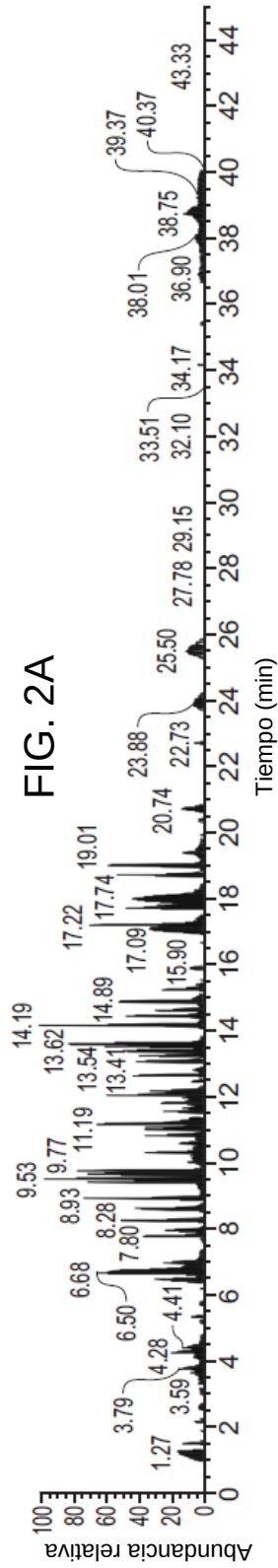


FIG. 2B

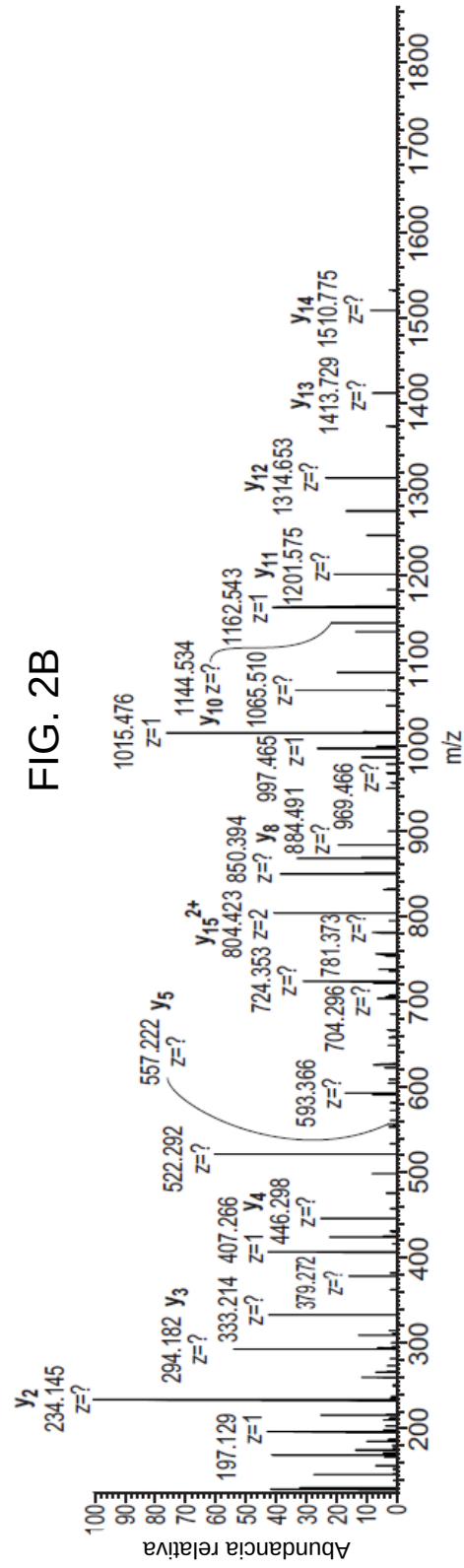


FIG. 2C

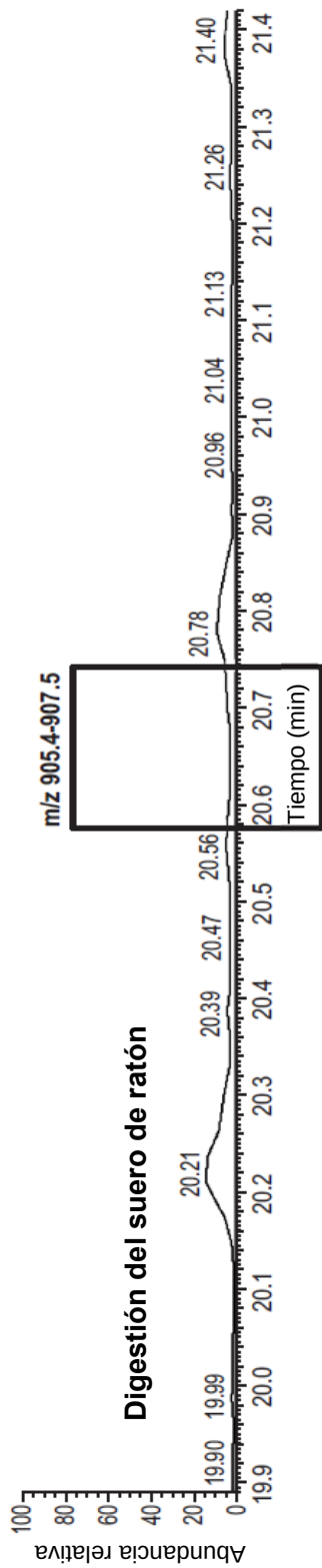


FIG. 3A

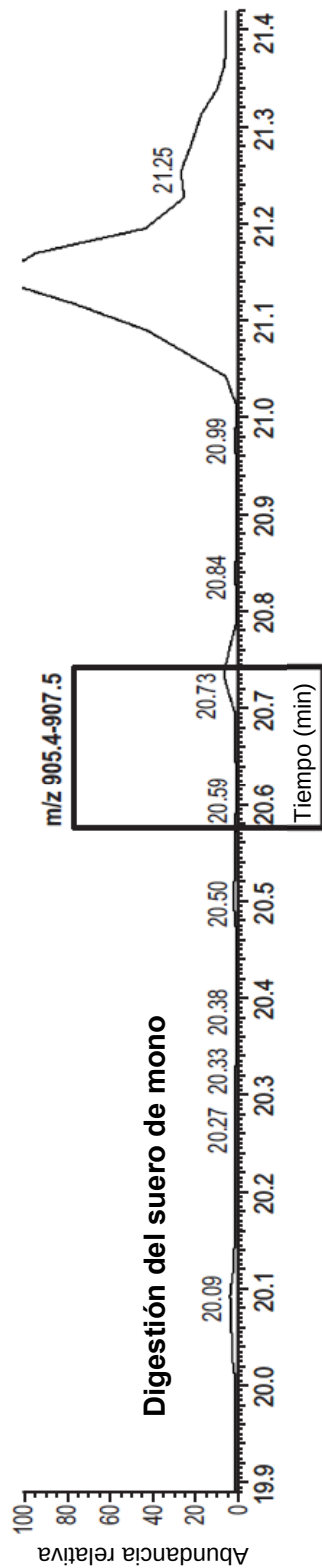


FIG. 3B

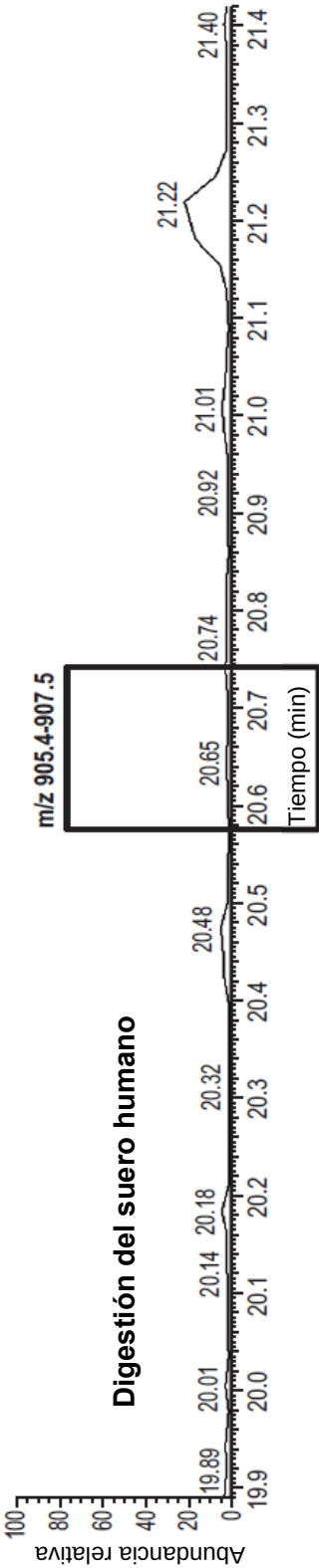


FIG. 3C

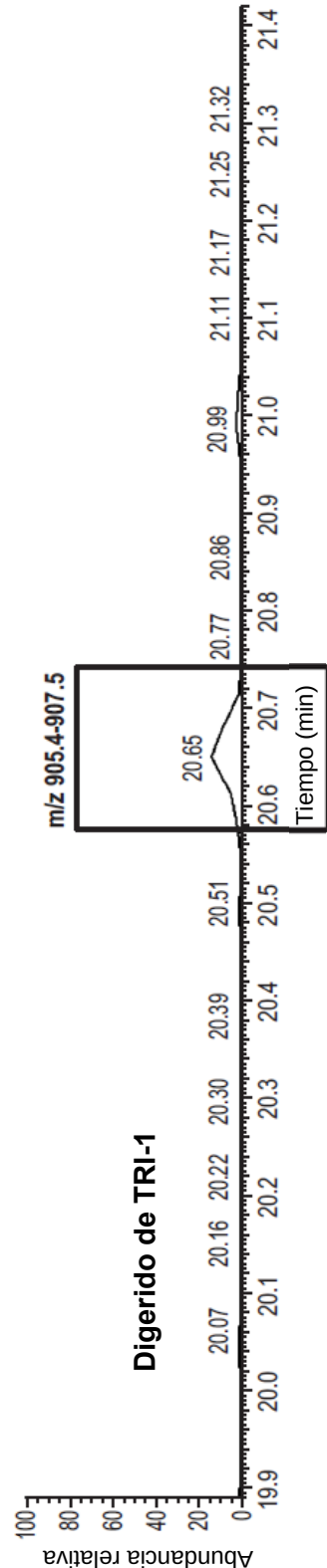


FIG.3D

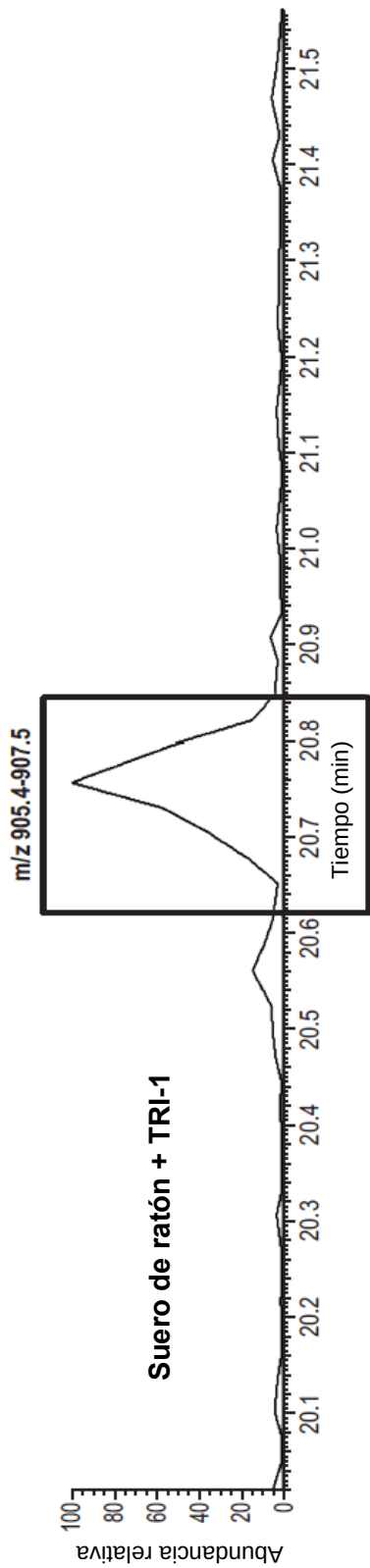


FIG. 4A

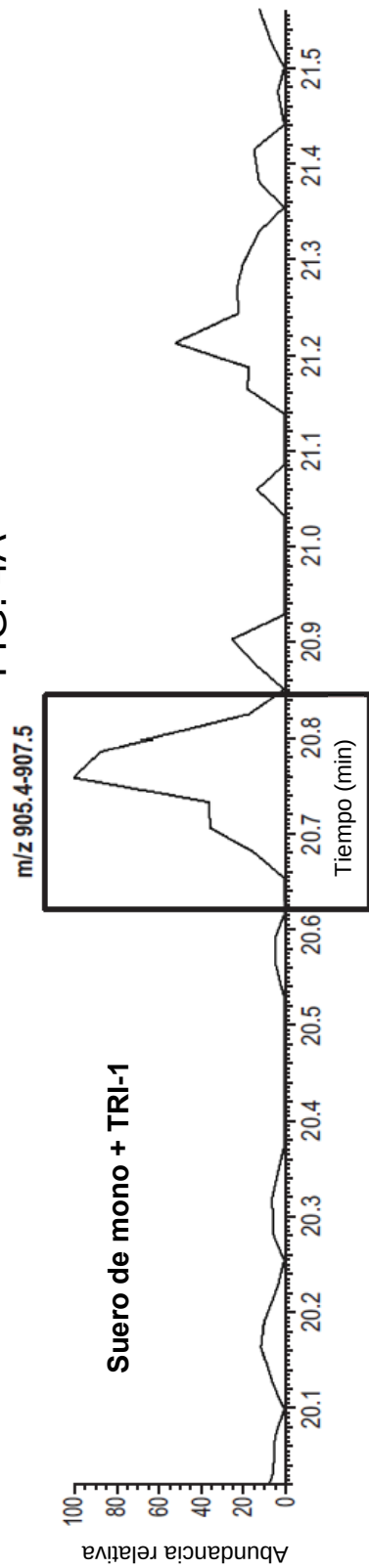


FIG. 4B

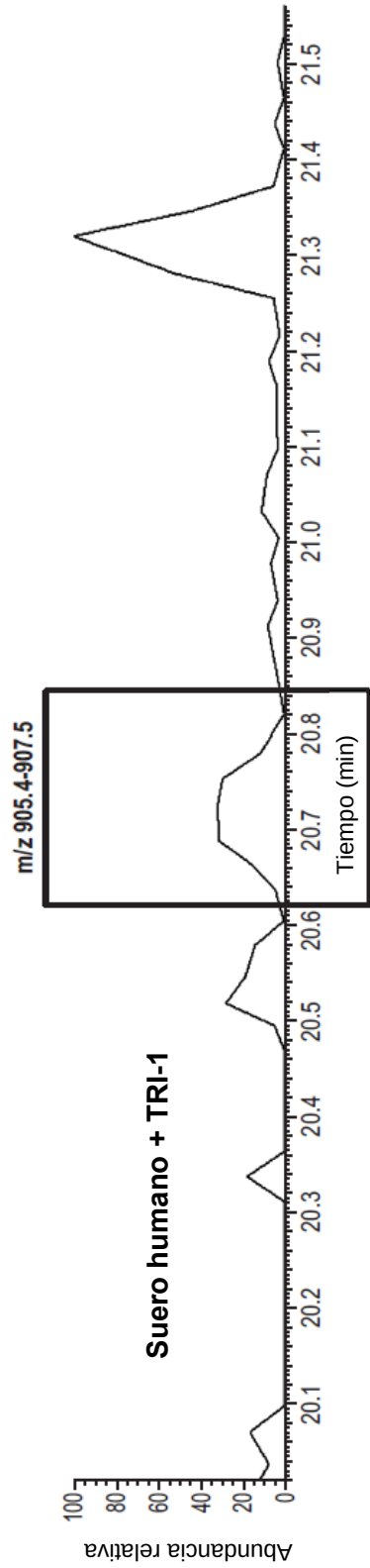


FIG. 4C

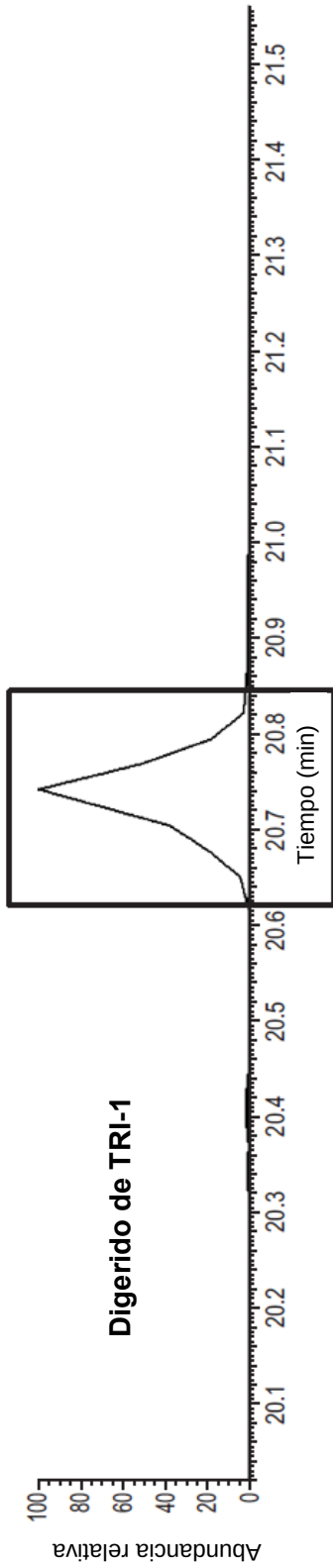


FIG. 4D

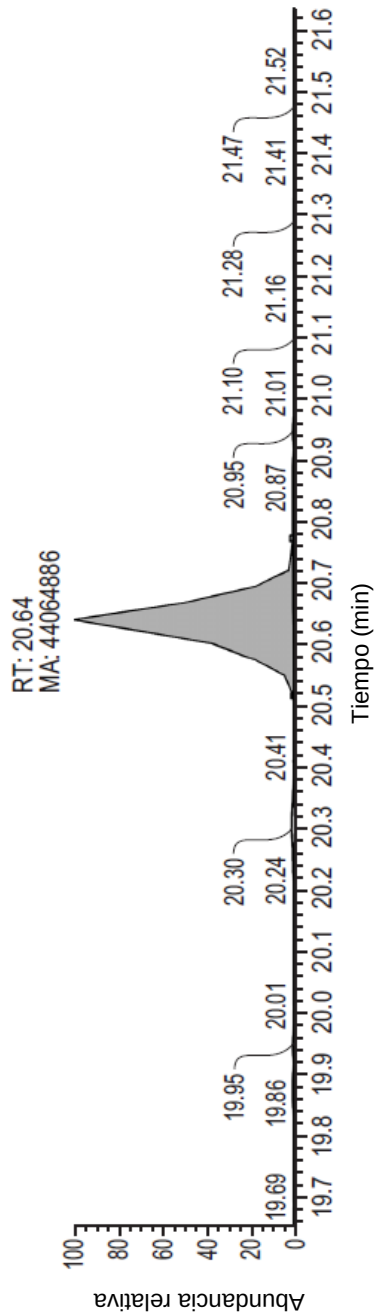


FIG. 5A

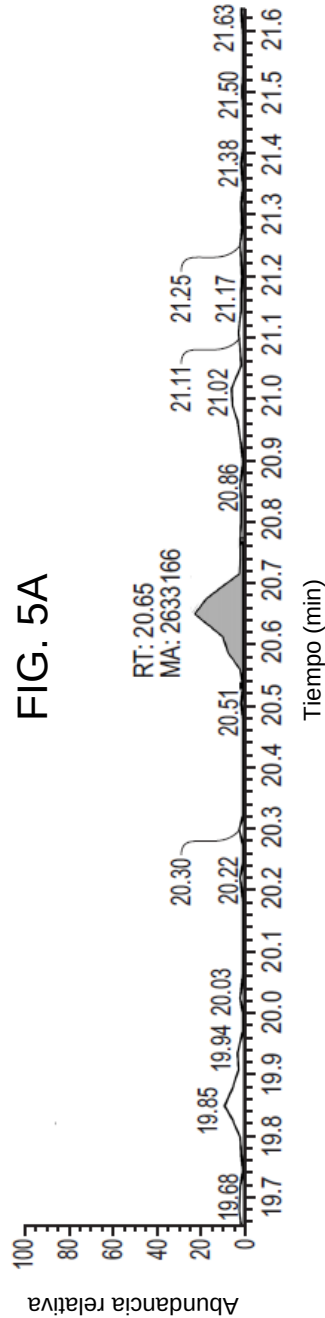


FIG. 5B

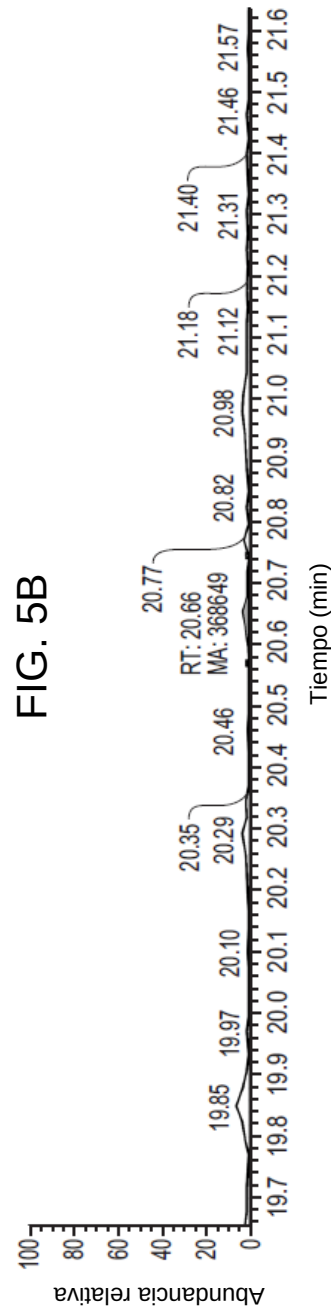


FIG. 5C

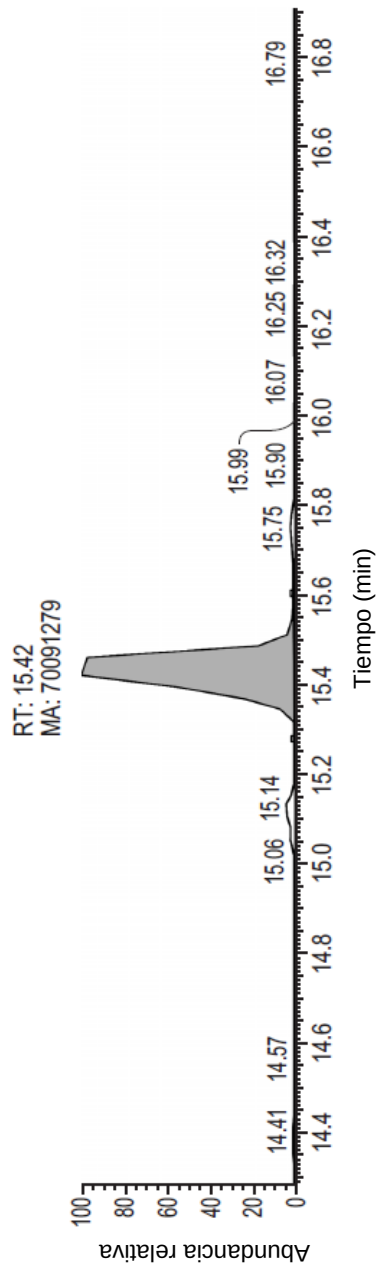


FIG. 6A

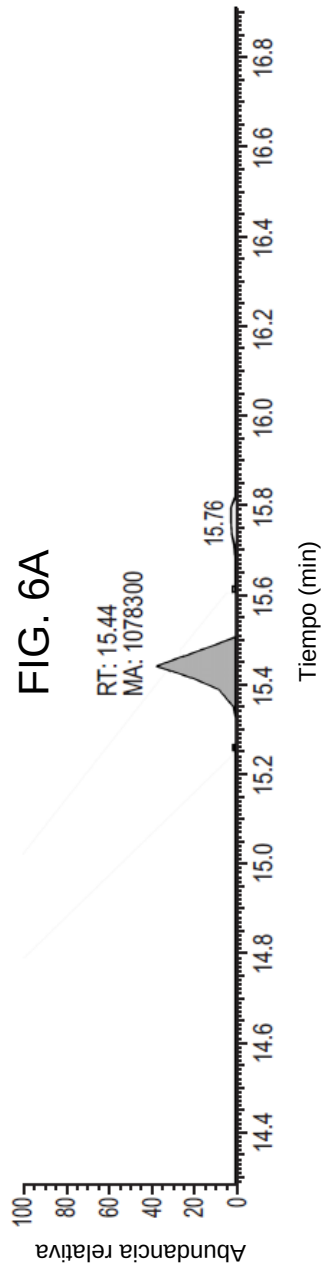


FIG. 6B

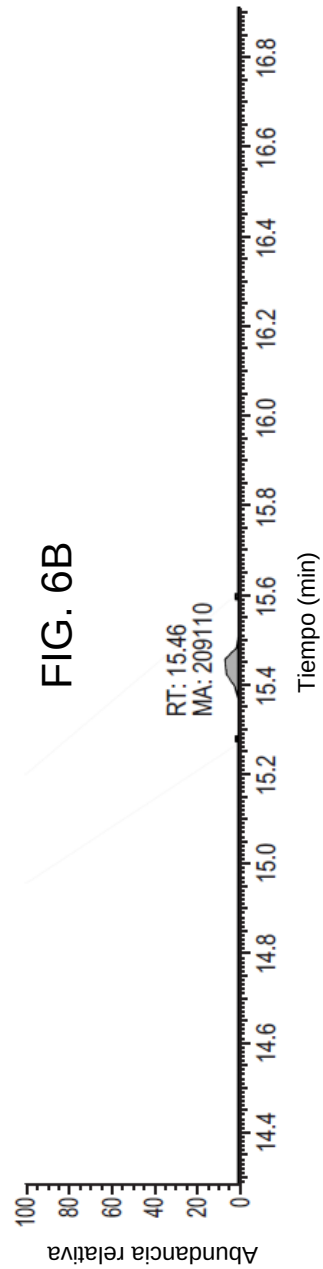


FIG. 6C

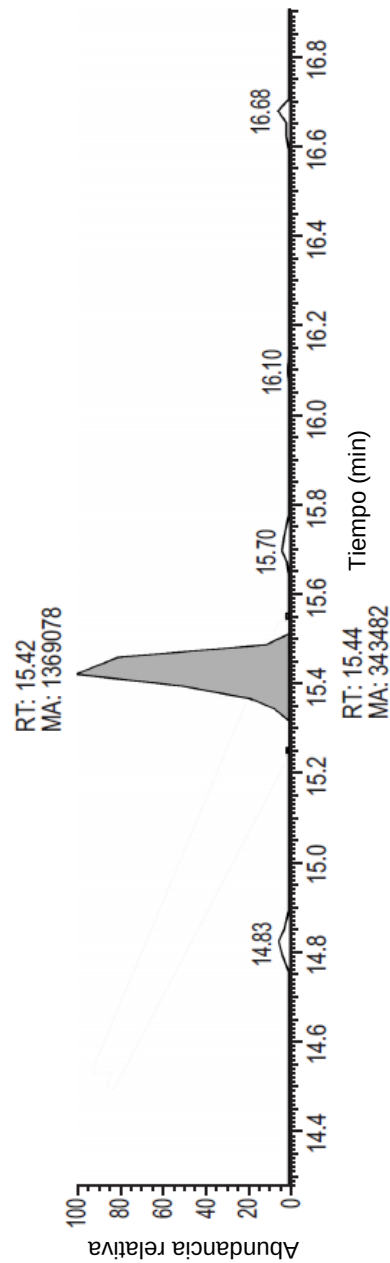


FIG. 7A

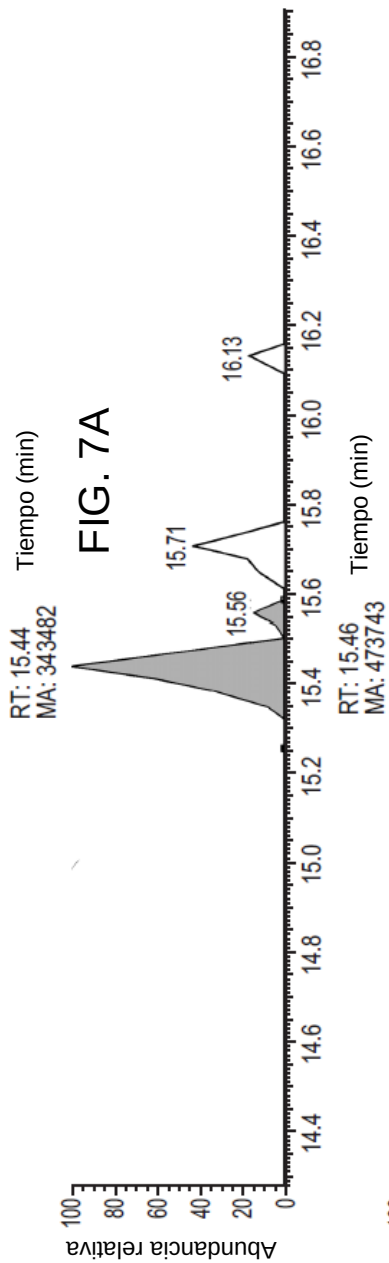


FIG. 7B

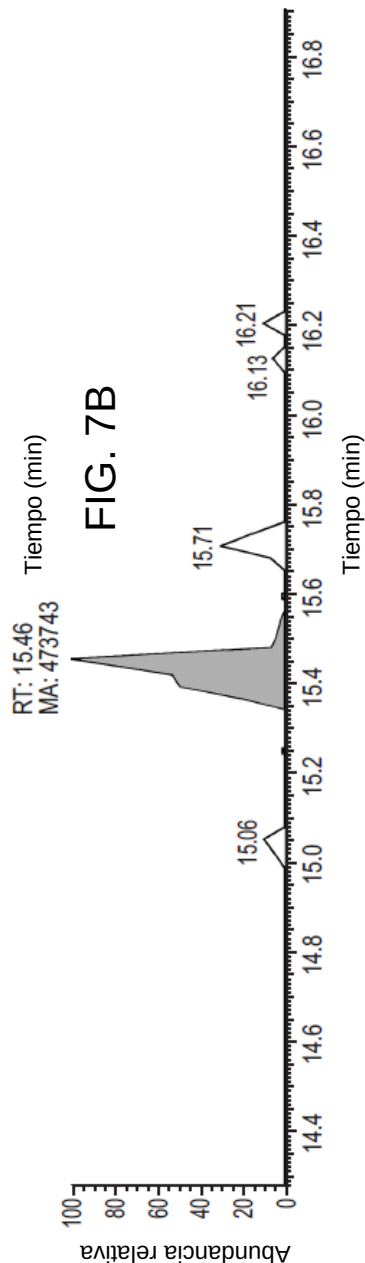


FIG. 7C

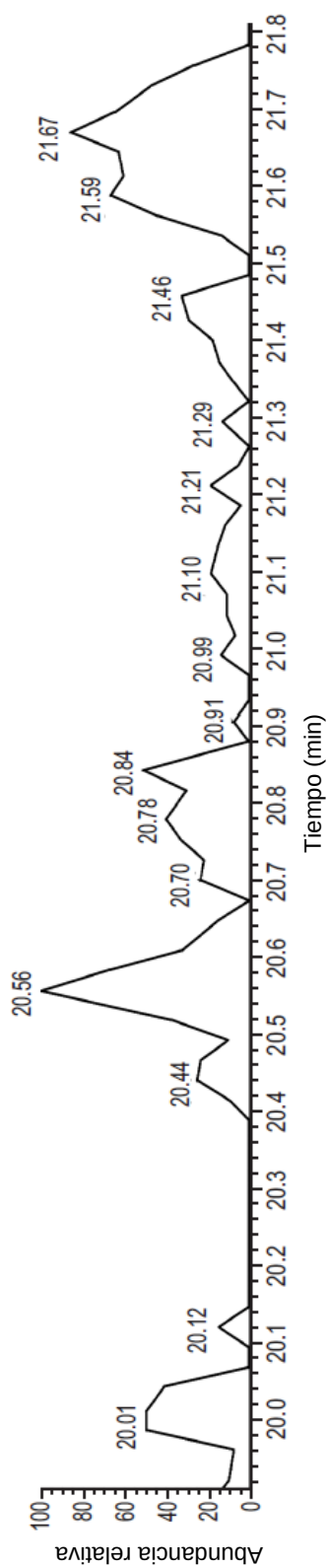


FIG. 8A

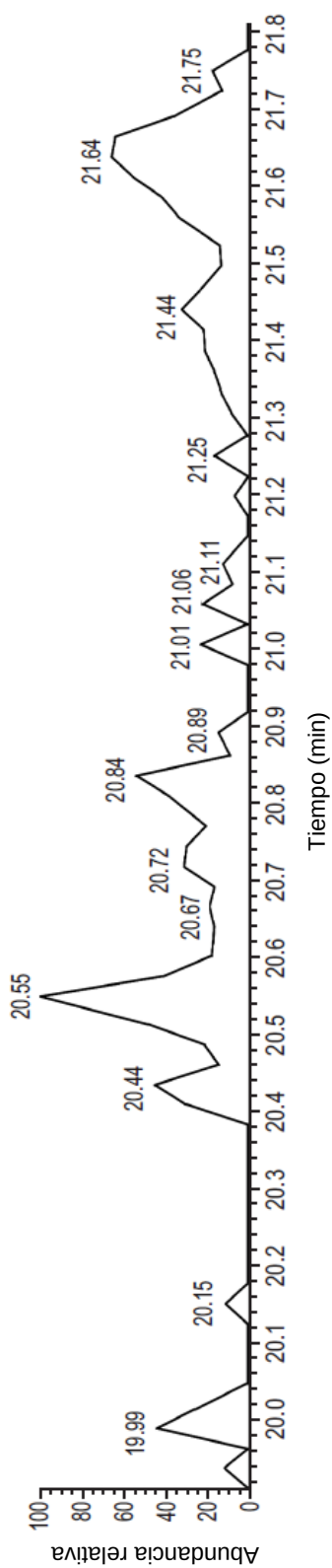


FIG. 8B

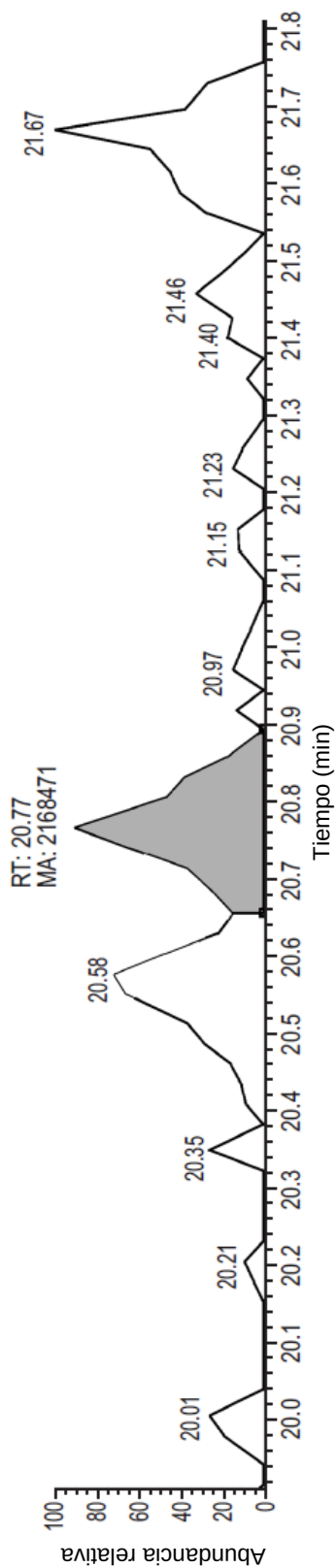


FIG. 8C

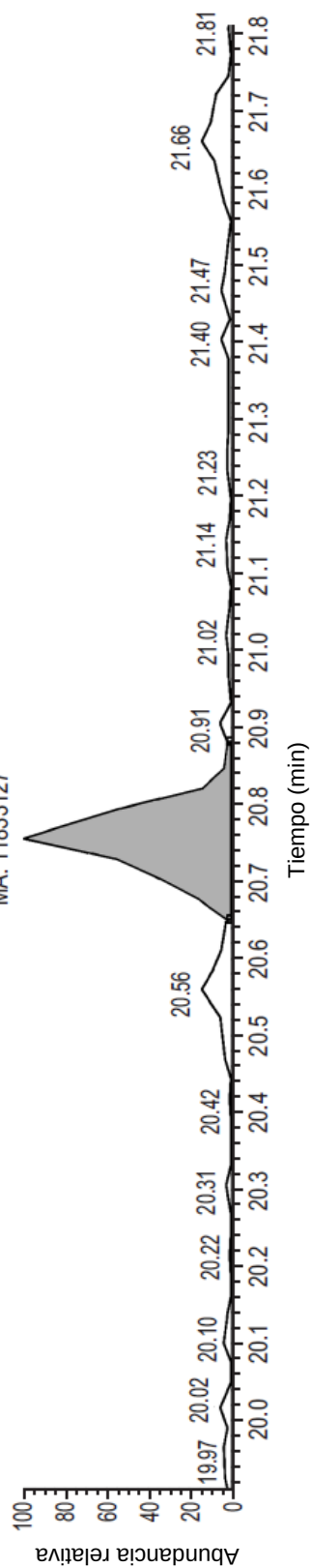
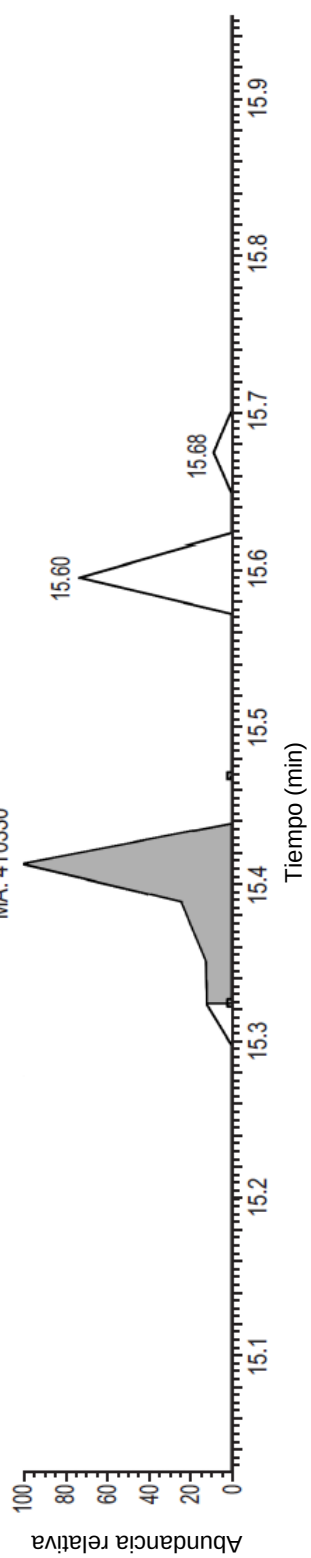
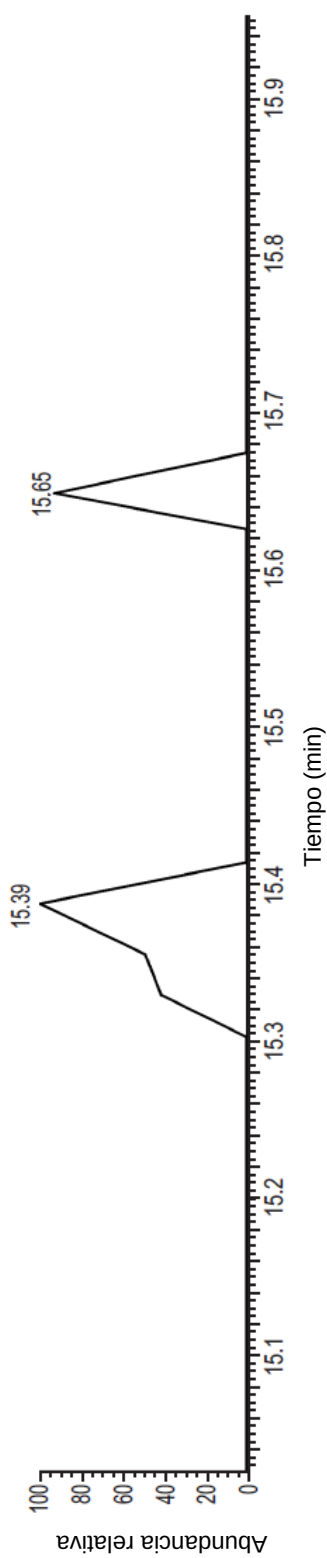


FIG. 8D



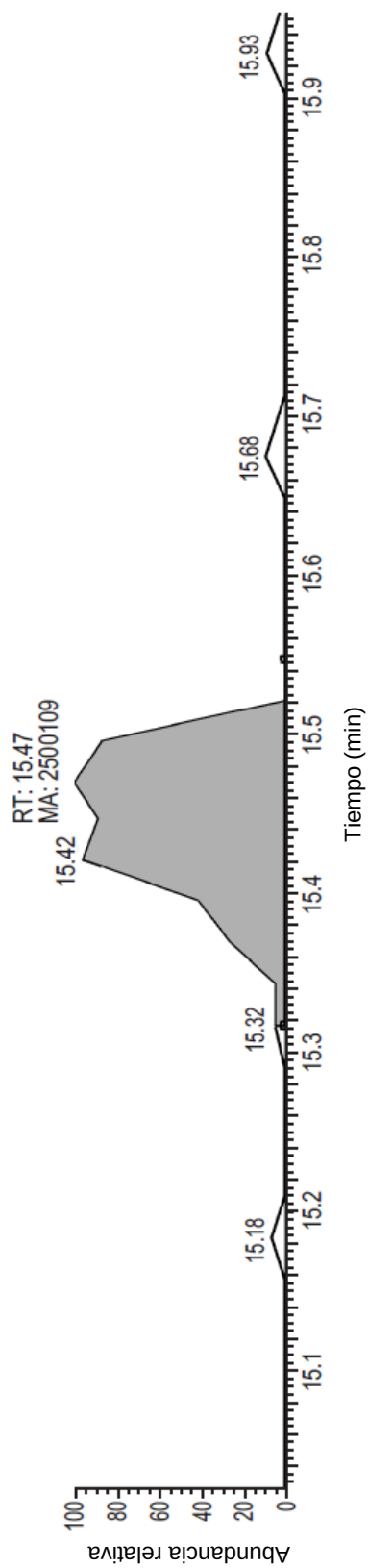


FIG. 9C

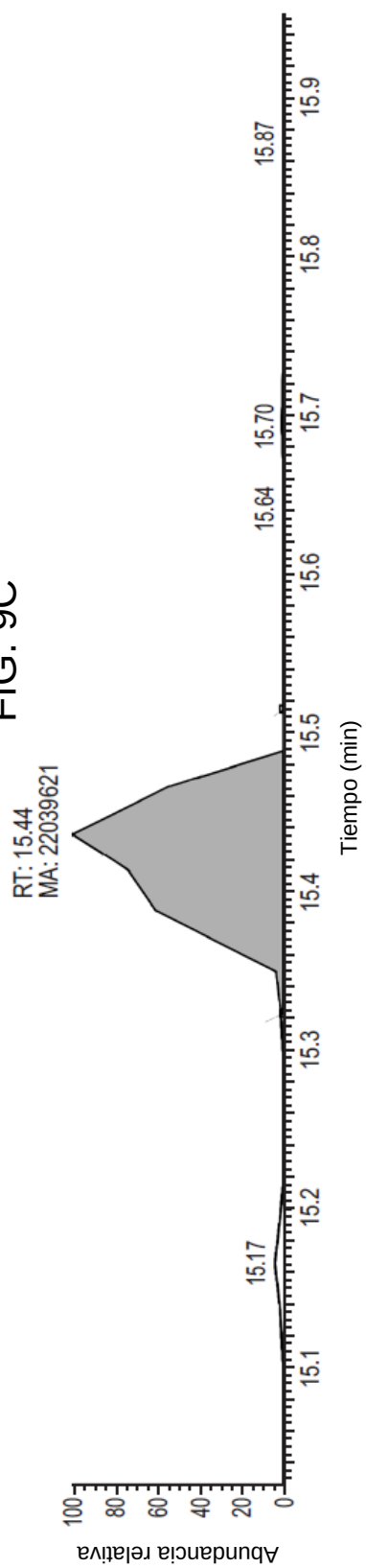


FIG. 9D

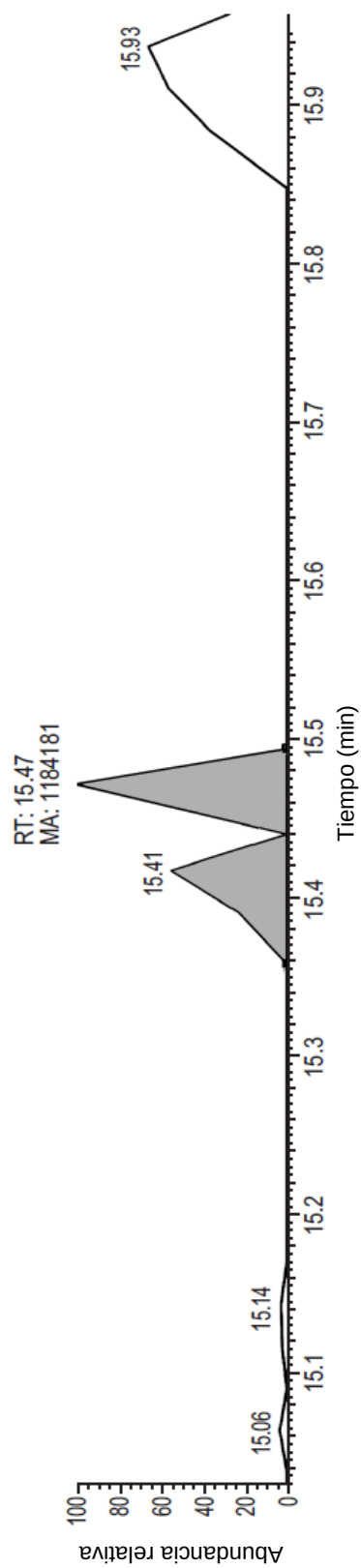


FIG. 10A

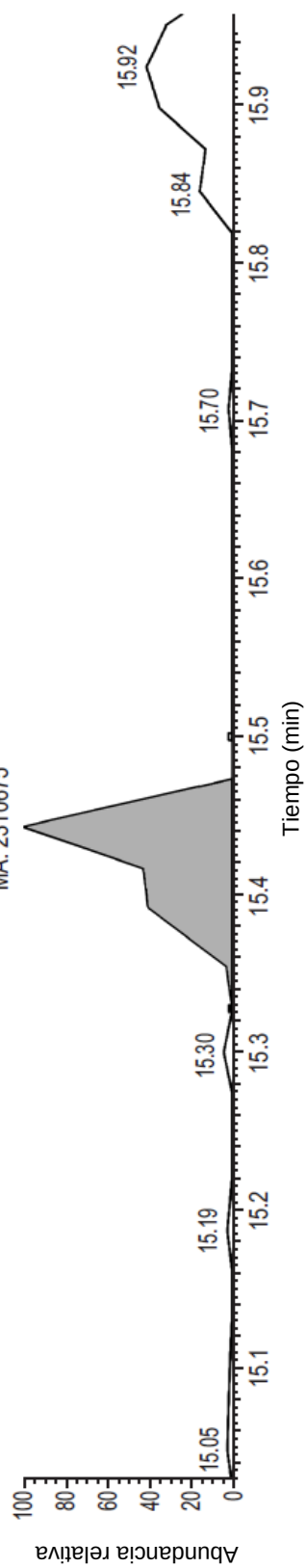


FIG. 10B

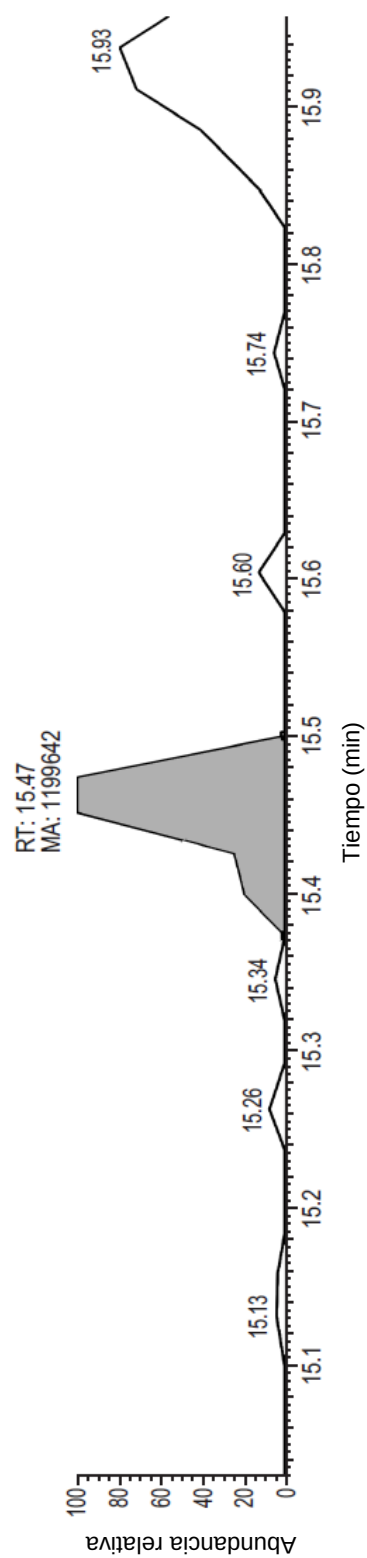


FIG. 10C

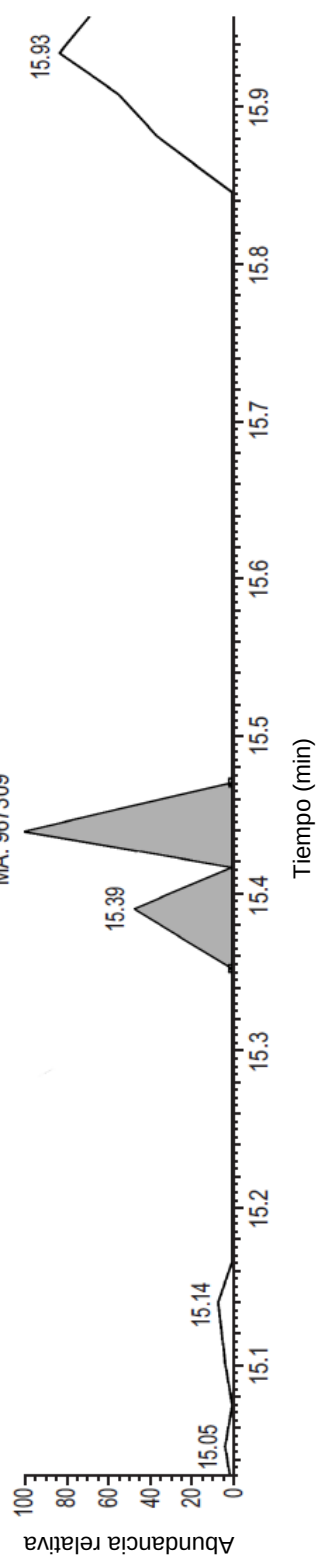


FIG. 10D

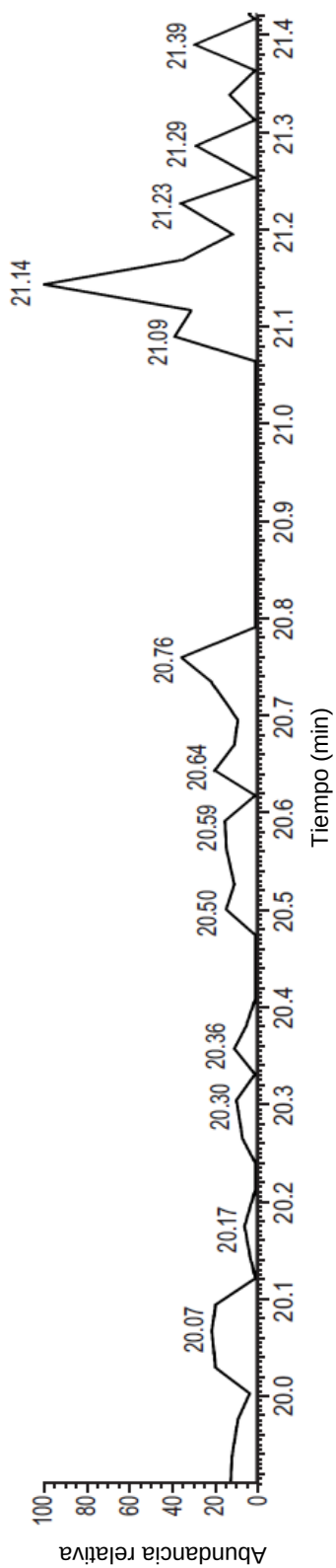


FIG. 11A

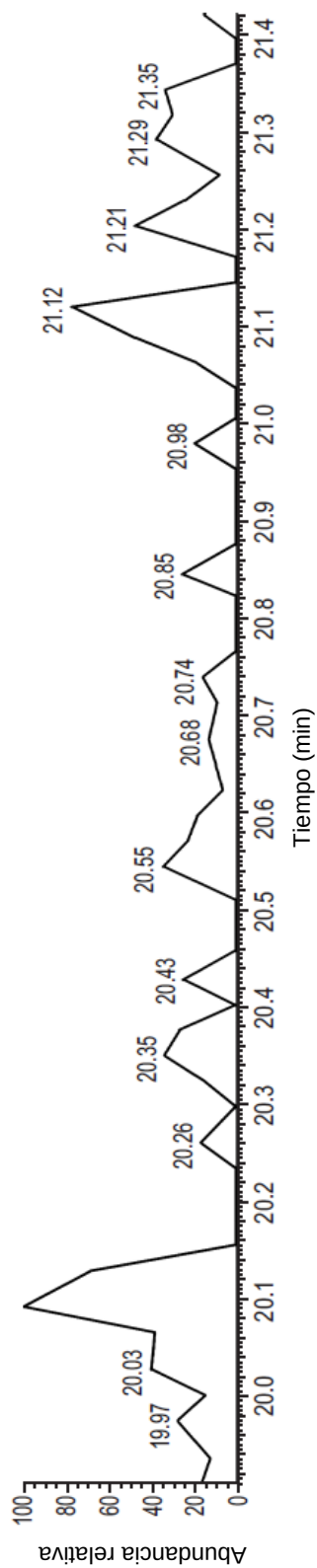


FIG. 11B

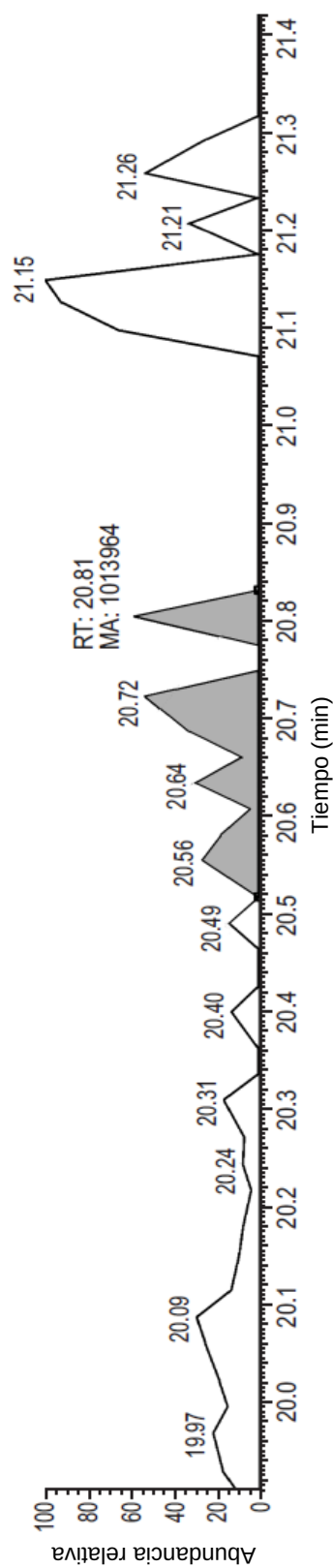


FIG. 11C

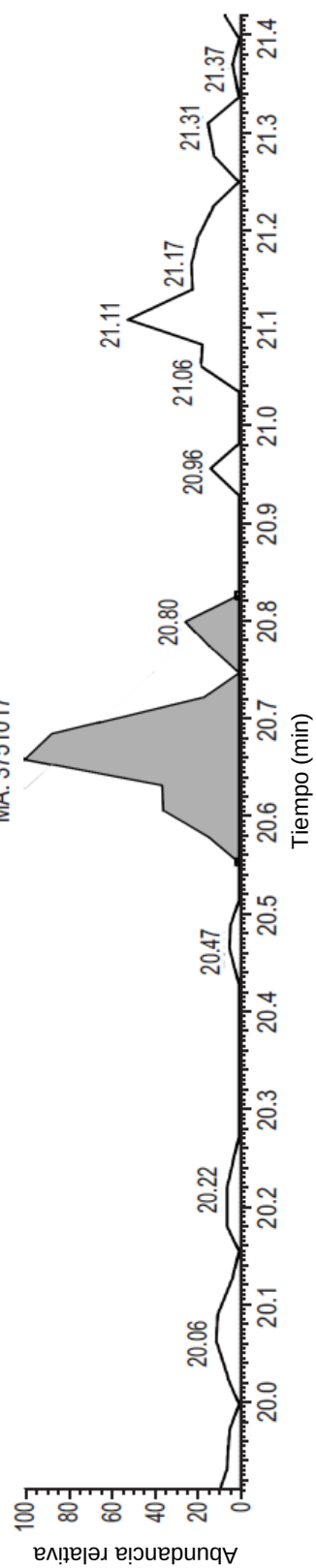
RT: 20.66
MA: 3751017

FIG. 11D

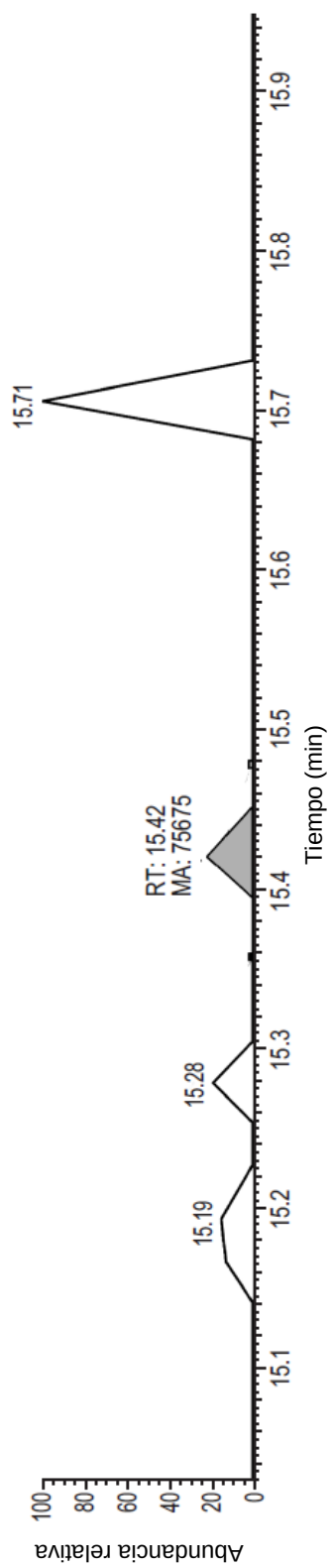


FIG. 12A

RT: 15.50
MA: 97731

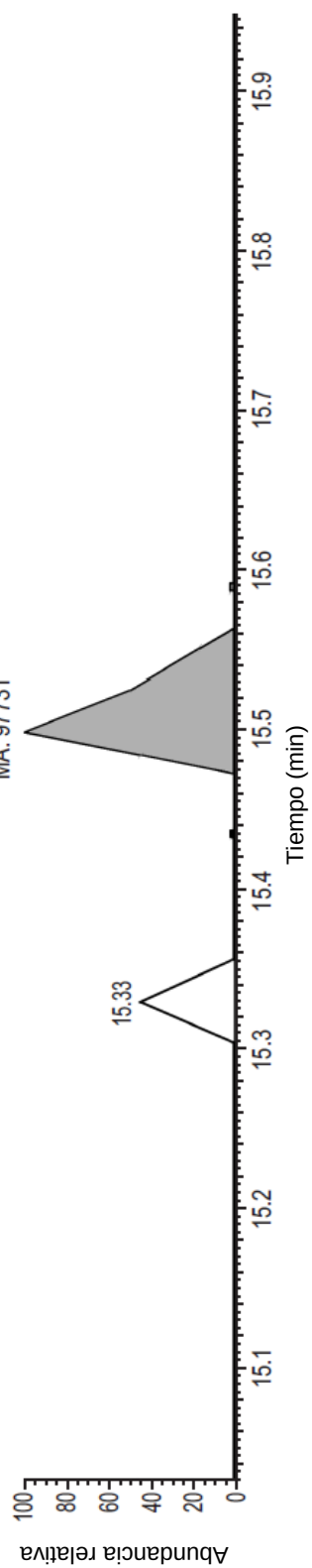


FIG. 12B

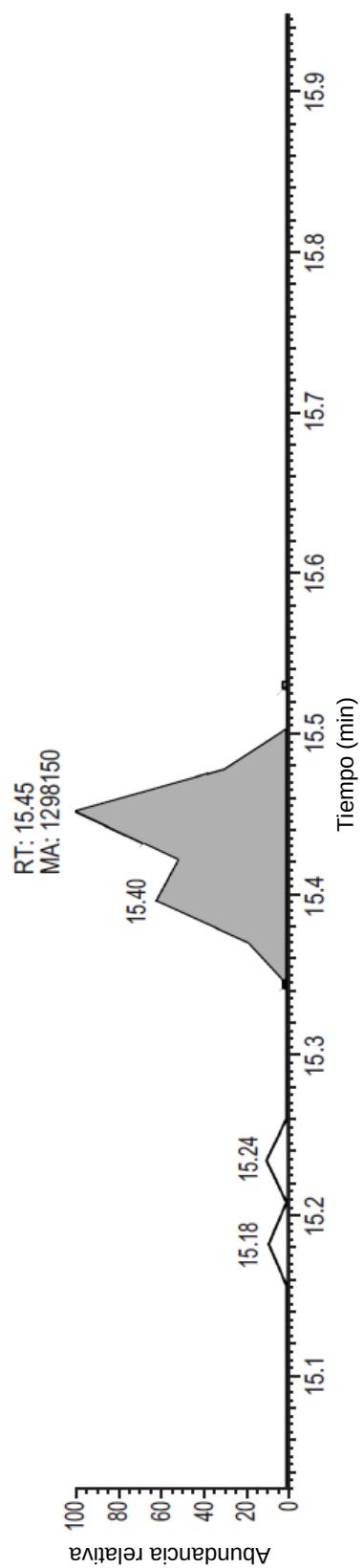


FIG. 12C

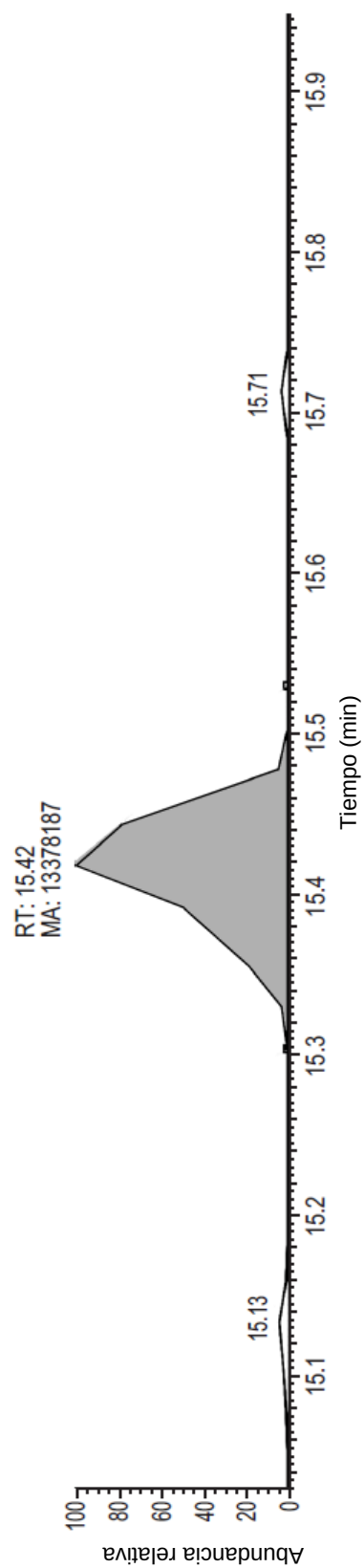


FIG. 12D

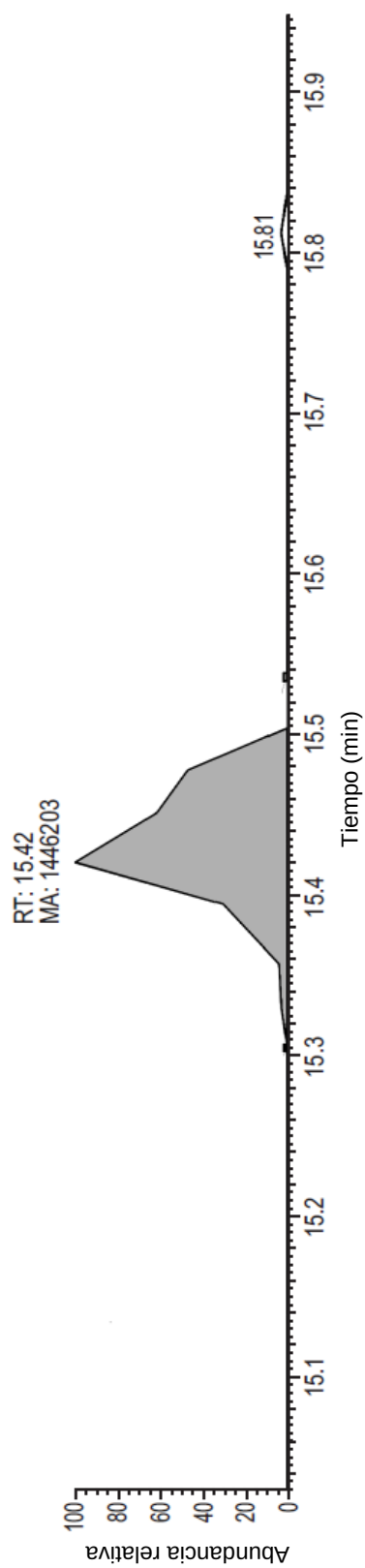


FIG. 13A

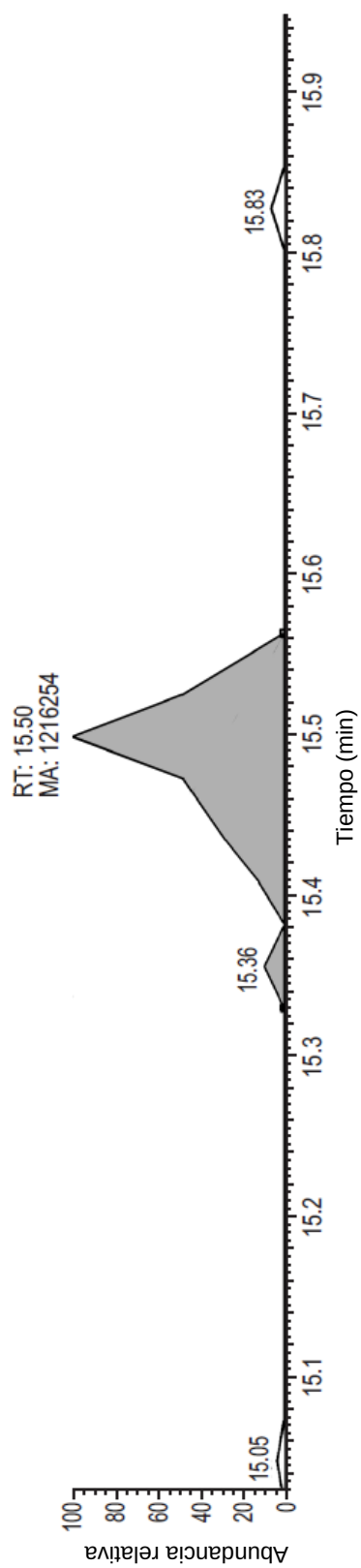


FIG. 13B

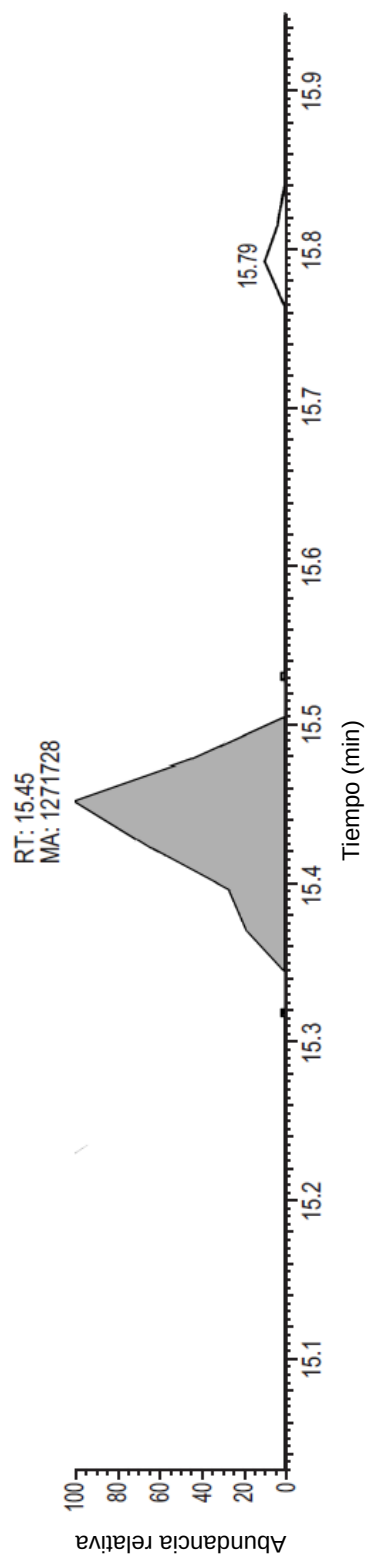


FIG. 13C

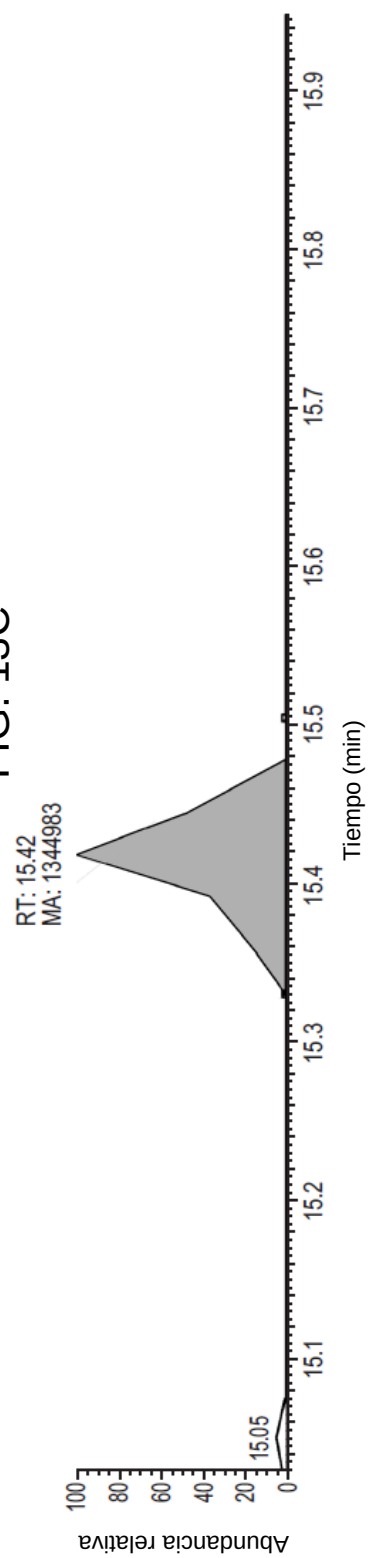


FIG. 13D

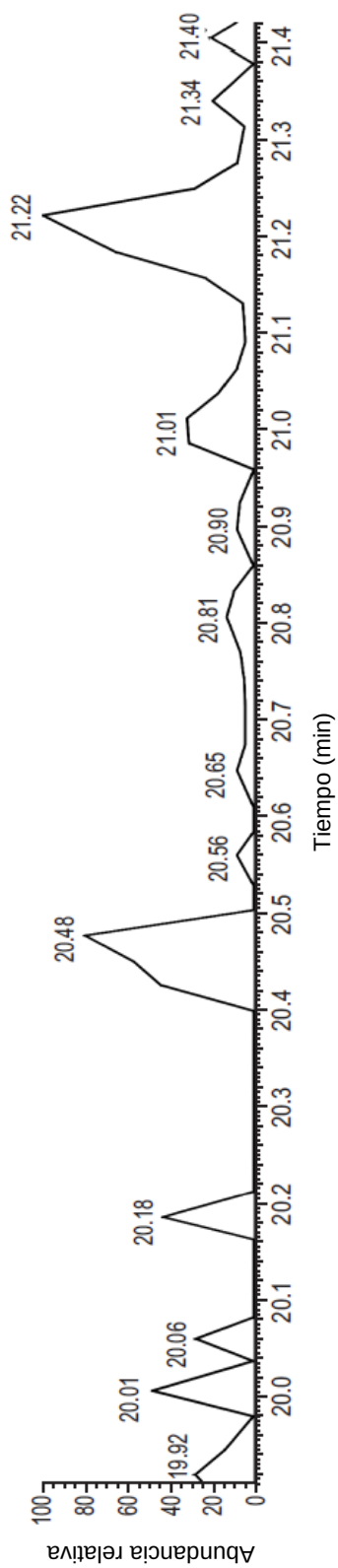


FIG. 14A

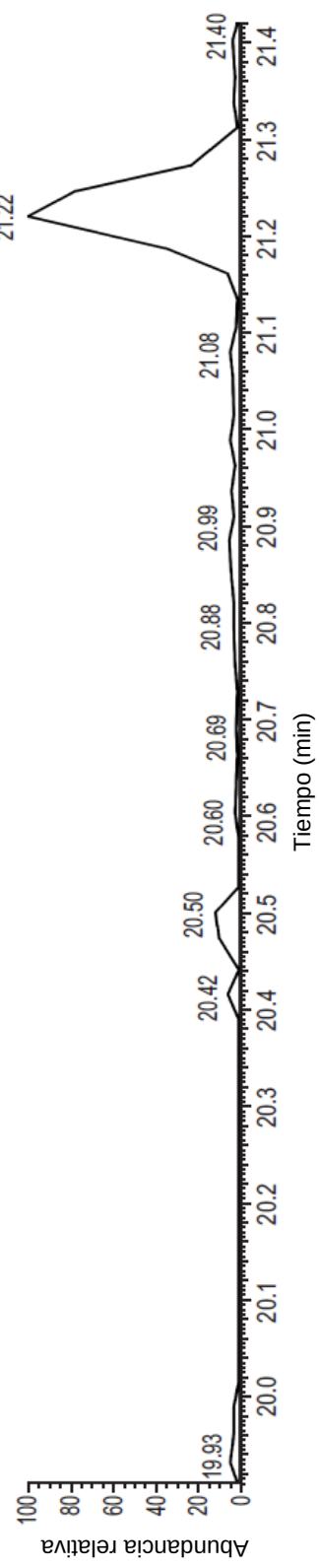


FIG. 14B

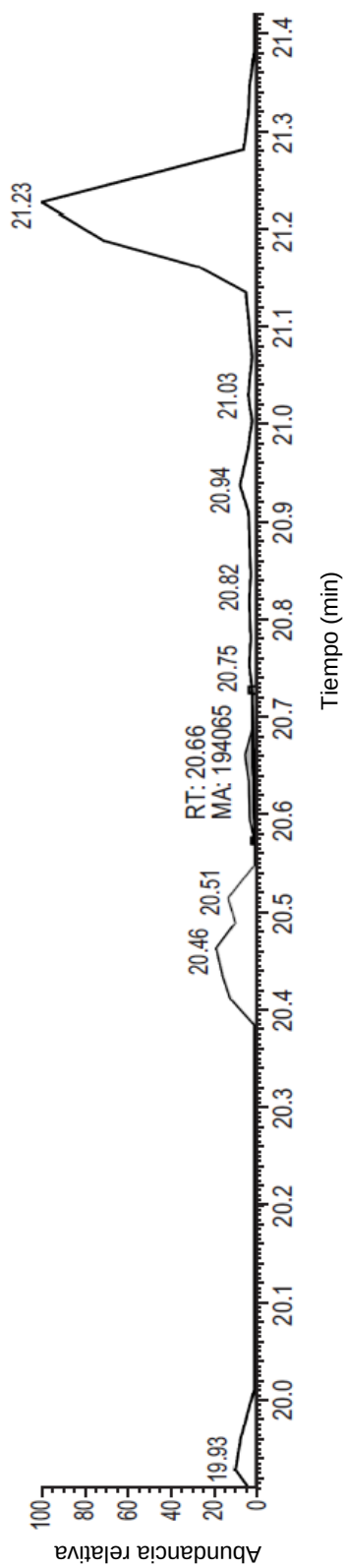


FIG. 14C

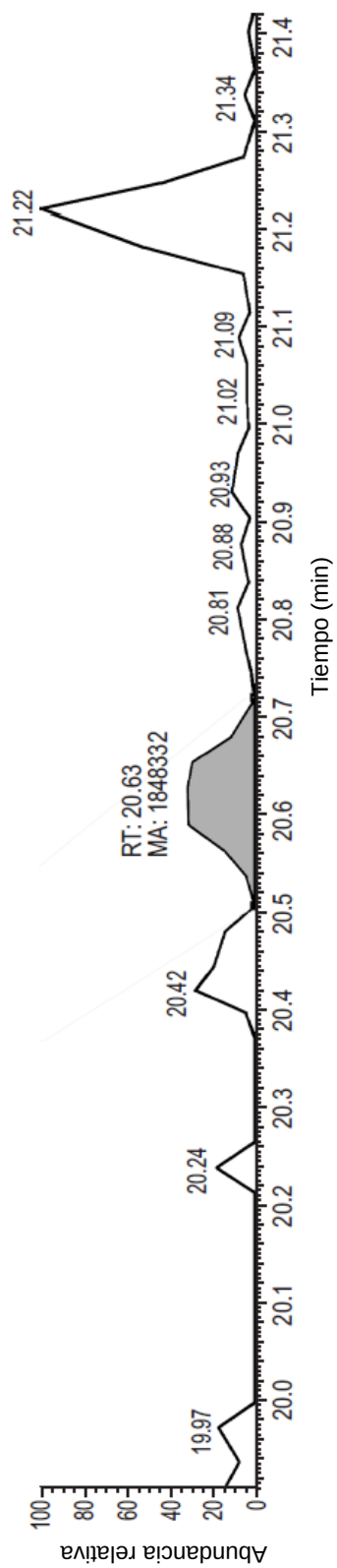


FIG. 14D

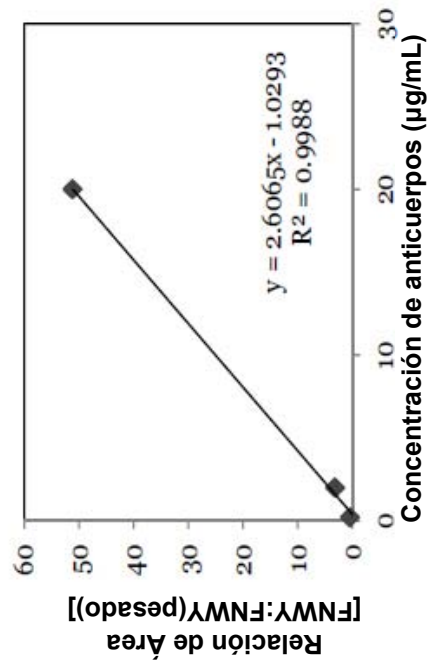


FIG. 15B

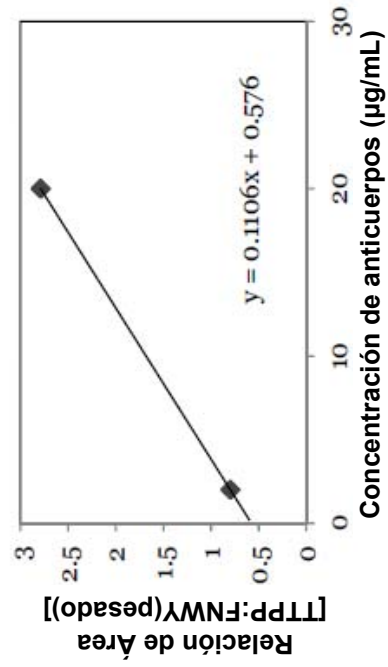


FIG. 15D

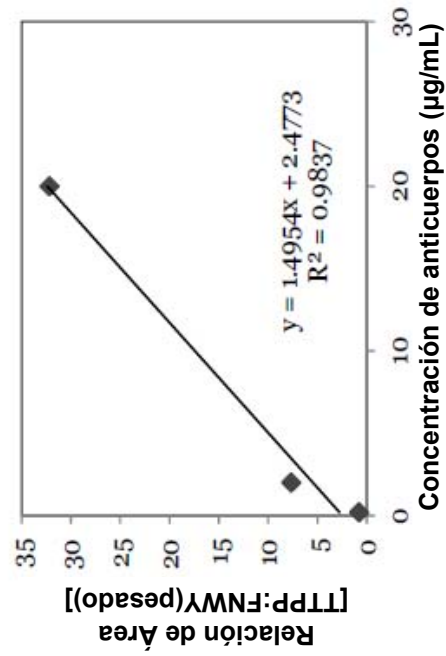


FIG. 15A

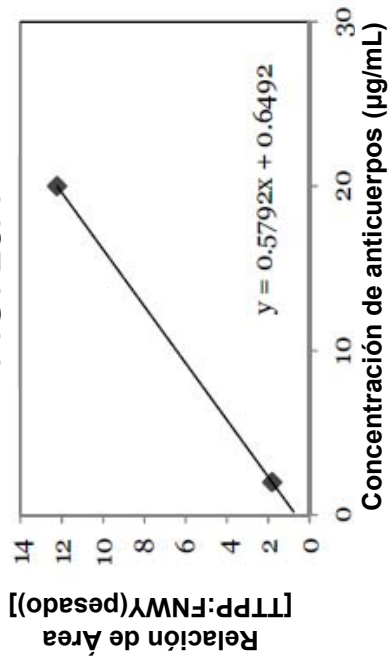


FIG. 15C

HC biespecífico

EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCASGFD FDNAMWTWVRQPPGKLEWVGRITGPGEGWSVDYAESVKGRFTISRDNTKNTLYLEMNNVRTEDTGYFCARTGK
 YYDFWSGYPPGEYFQDWGGTLVIVSSDKTHQTQVHLTQSGPEVRKPGTSVKVSCKAPGNTLKTYDLHWVRSPGQGLQWGMWISHEGDKKIVVERFKAKVTI
 DWDRSTNTAYLQLSGLTSGDTAVYYCAKAGSKHRLRDYALYDDGALNMAVDVDYLSNLEFWGGTAVTVSSDKTHASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYIT
 LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK**TTTPPVLDSDGSFFLYS**KLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO: 12)

LC biespecífico

DEVLTQSPHSLSVTPGESASISCKSSHSLIHGDRNNYLAWYVQKGRSPQLLIYLASSRASGVDPDRFSGSGSKDKFTLKISRVEDTVGTYTCMQ**GRESPTWF**
GQGTKVDIKDKTHTASELTQDPAVSVALKQTVTITCRGDSLRSHYASWYQKPGQAPVLLFYGKNNRPSGI PDRFSGSASGNRASLTITGAQAEDEADYYCSS
 RDKSGSRLSVFGGTKLTVDKTHTRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK**DS****STYLSSTITLSKAD**
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 13)

HC

QVQLVQSGGQMKPKGPESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPRGAVNYPARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLERSLTVDDTAVYFCTRGKNCD
 YNWD FEHWGRGTPVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK**DTLMISRT**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK**TPPVLDSDGSFFLV**S
KLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 14)

LC

EIVLTQSPGTLSLSPGETAIIISRTSQYQSLAWYQORPGQAPR**LVISGSTR**AAGIPDRFSGSRWGPDPNLTISNLESGDFGVYCCQYEFFGQGTKVQVDIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEC (SEQ ID NO: 15)

FIG. 16

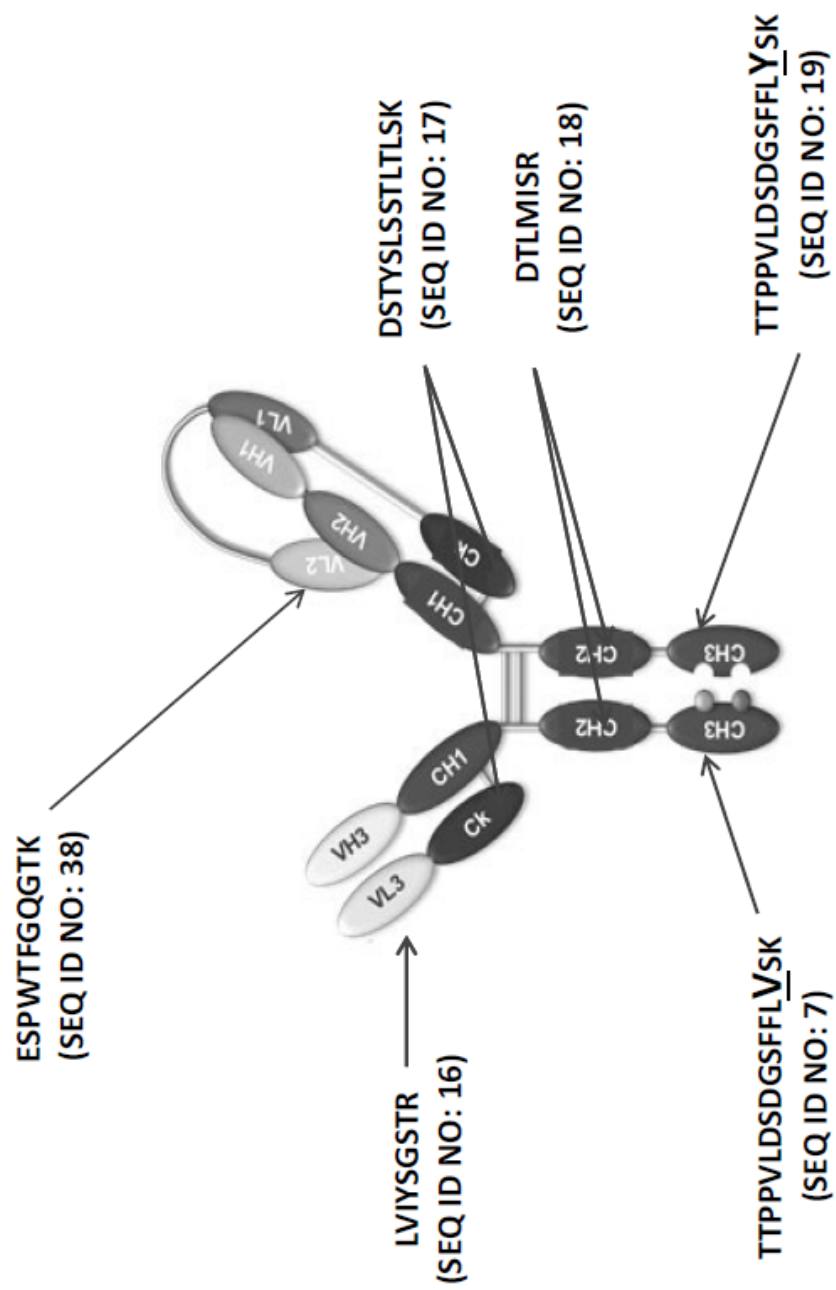


FIG. 17

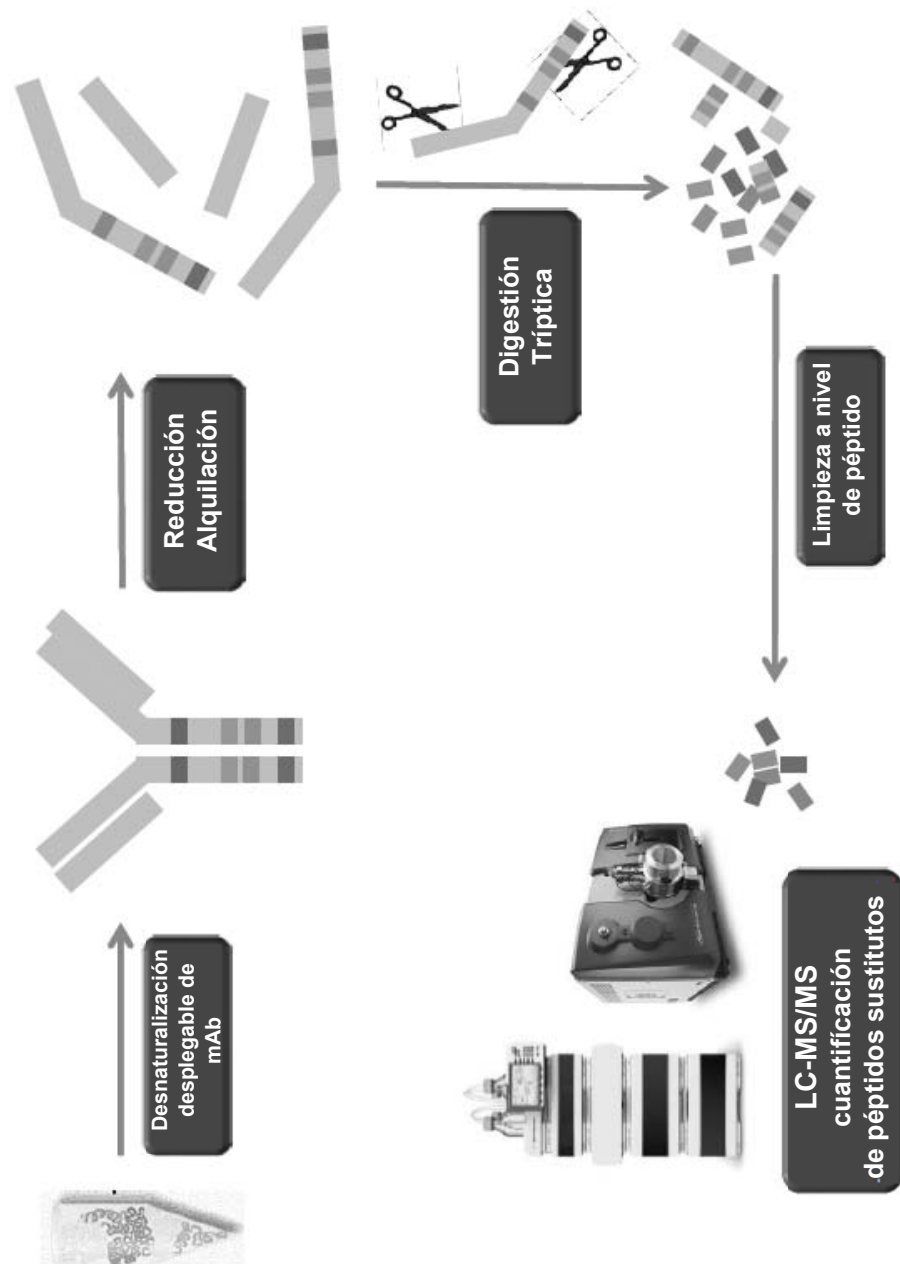


FIG. 18

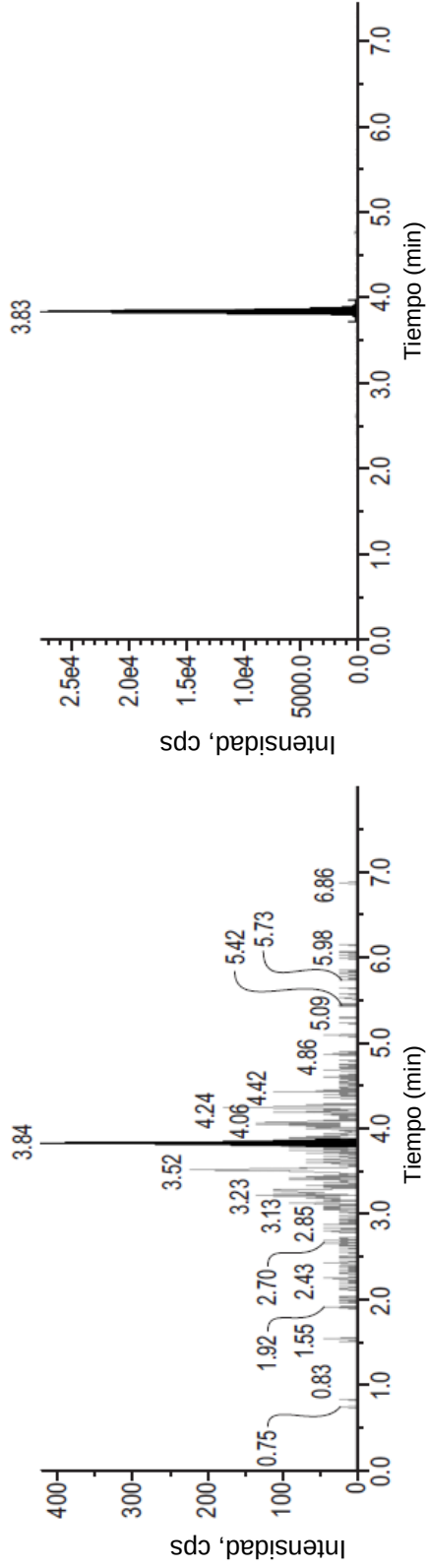


FIG. 19B

FIG. 19A

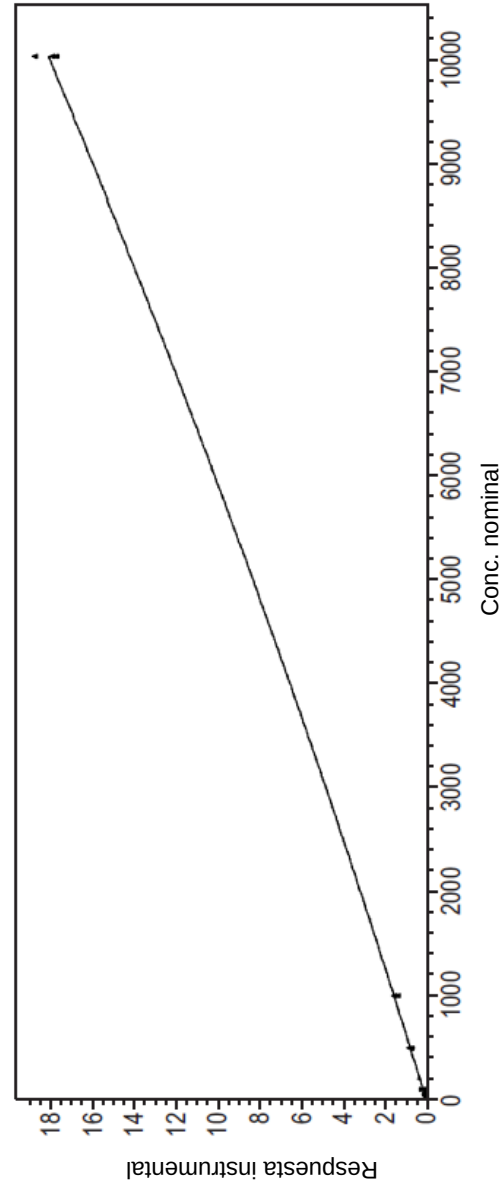
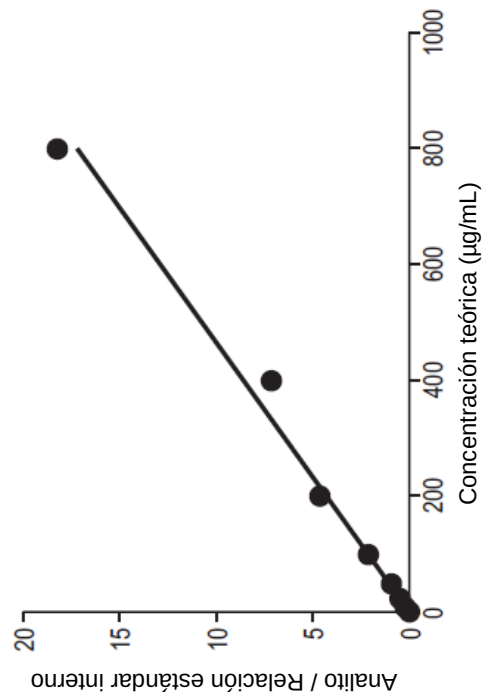


FIG. 19C

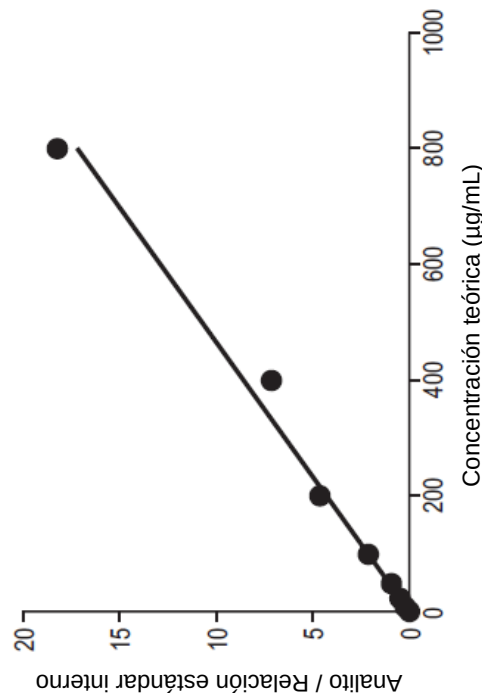
Curva de Suero 1
(0.012 a 800 µg/mL Anticuerpo
triespecífico)



Intersección Y	0.001198
Pendiente	0.02149
R cuadrada (ponderada)	0.9901

FIG. 20A

Curva de Suero 2
(0.012 a 800 µg/mL Anticuerpo
triespecífico)



Intersección Y	0.0008343
Pendiente	0.02139
R cuadrada (ponderada)	0.9899

FIG. 20B

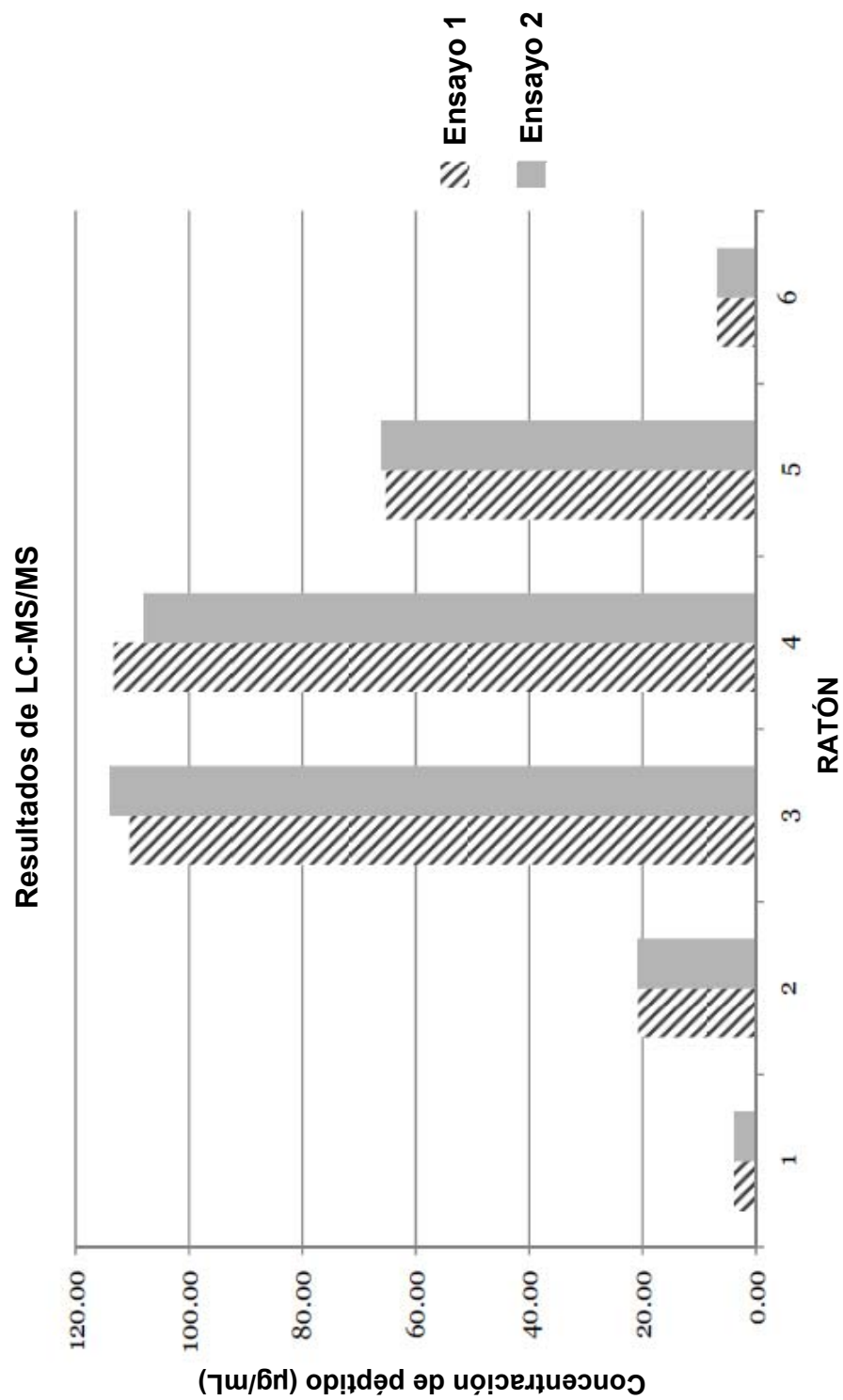


FIG. 21A

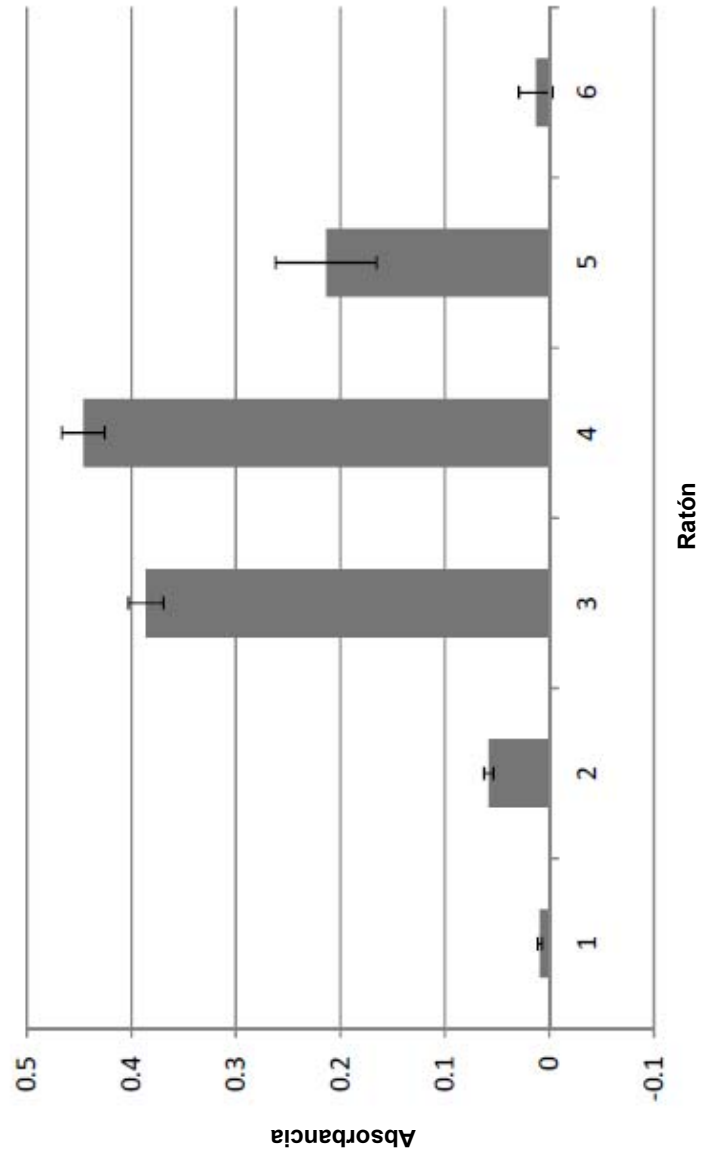


FIG. 21B

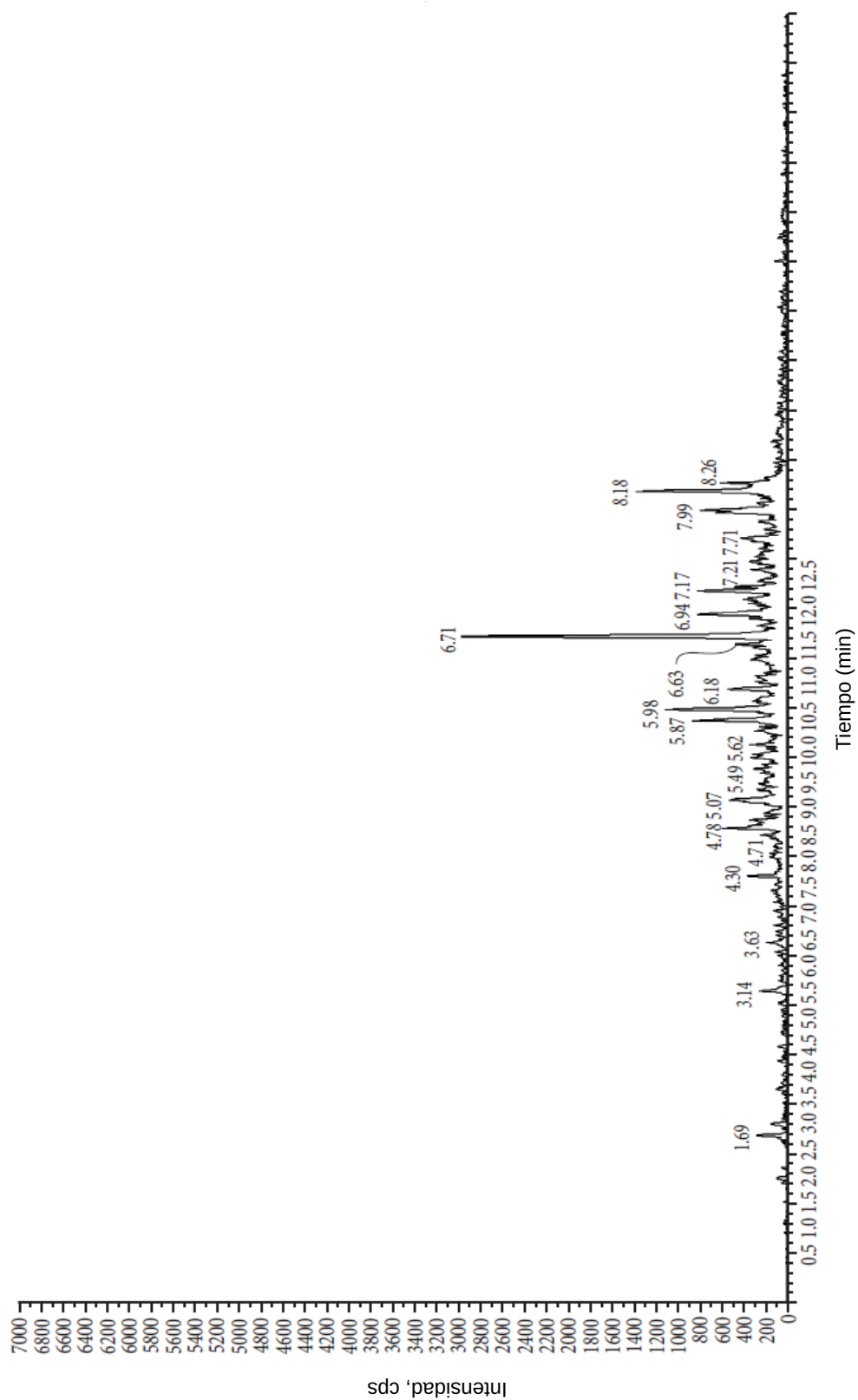


FIG. 22A

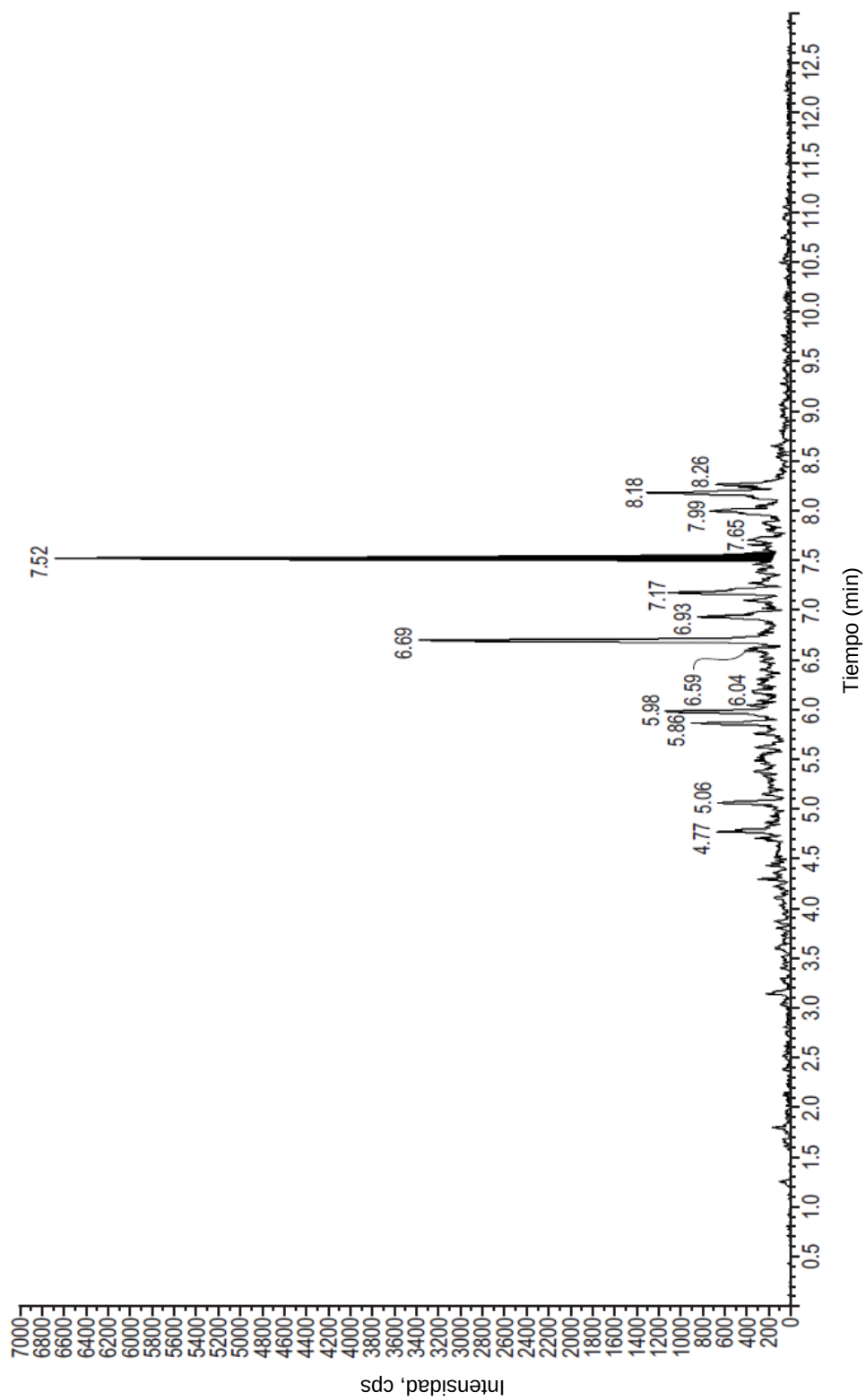


FIG. 22B

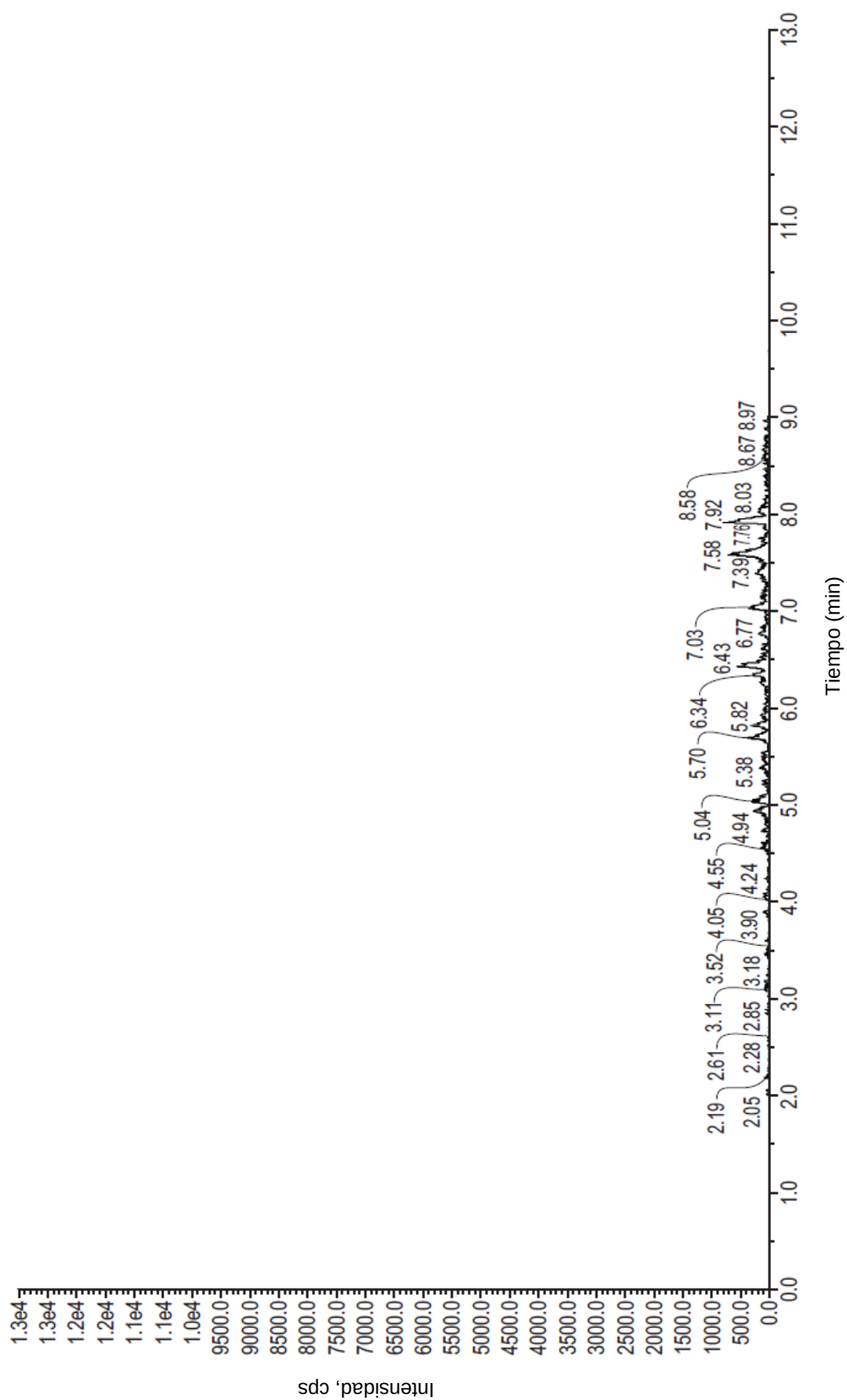


FIG. 22C

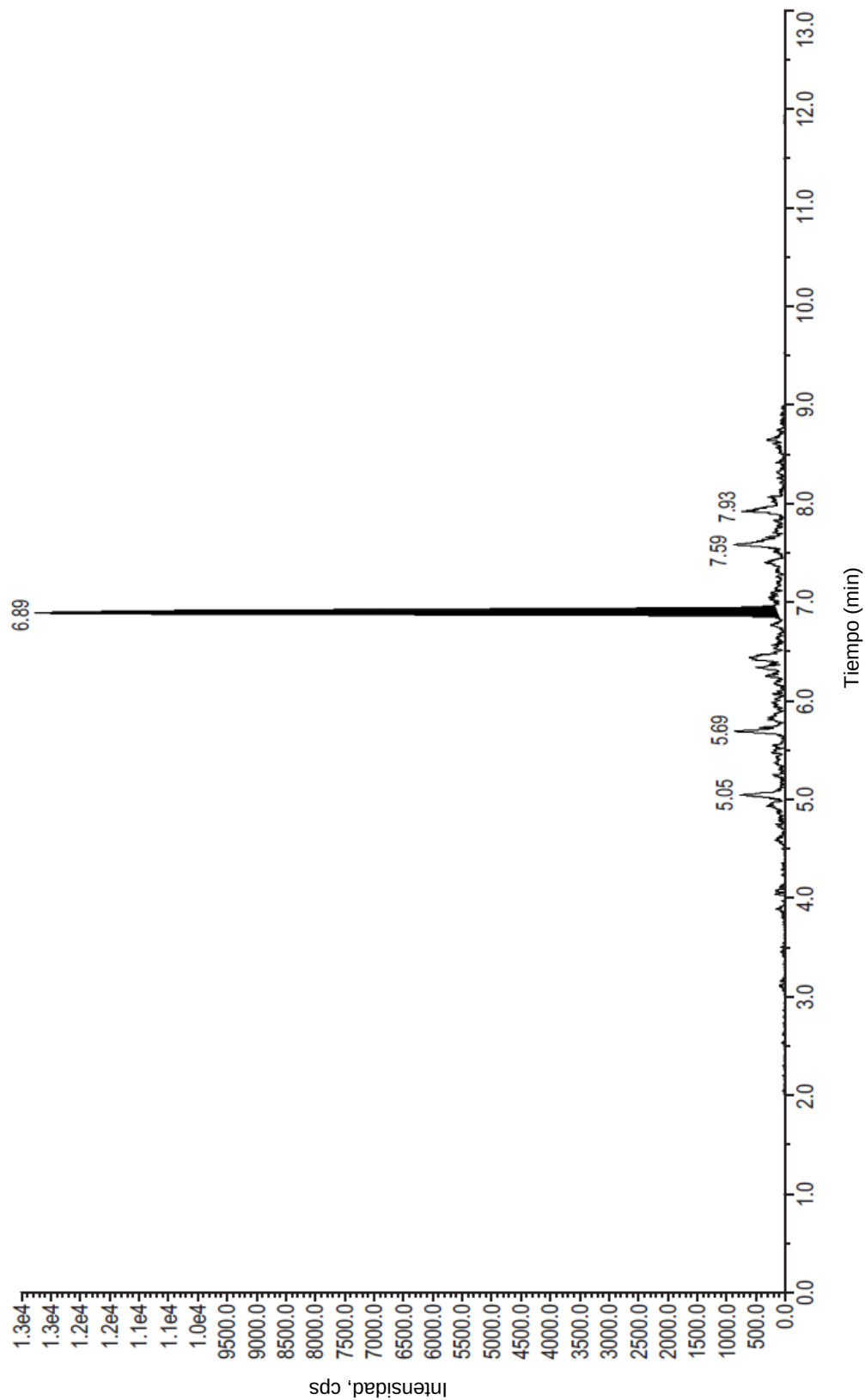


FIG. 22D

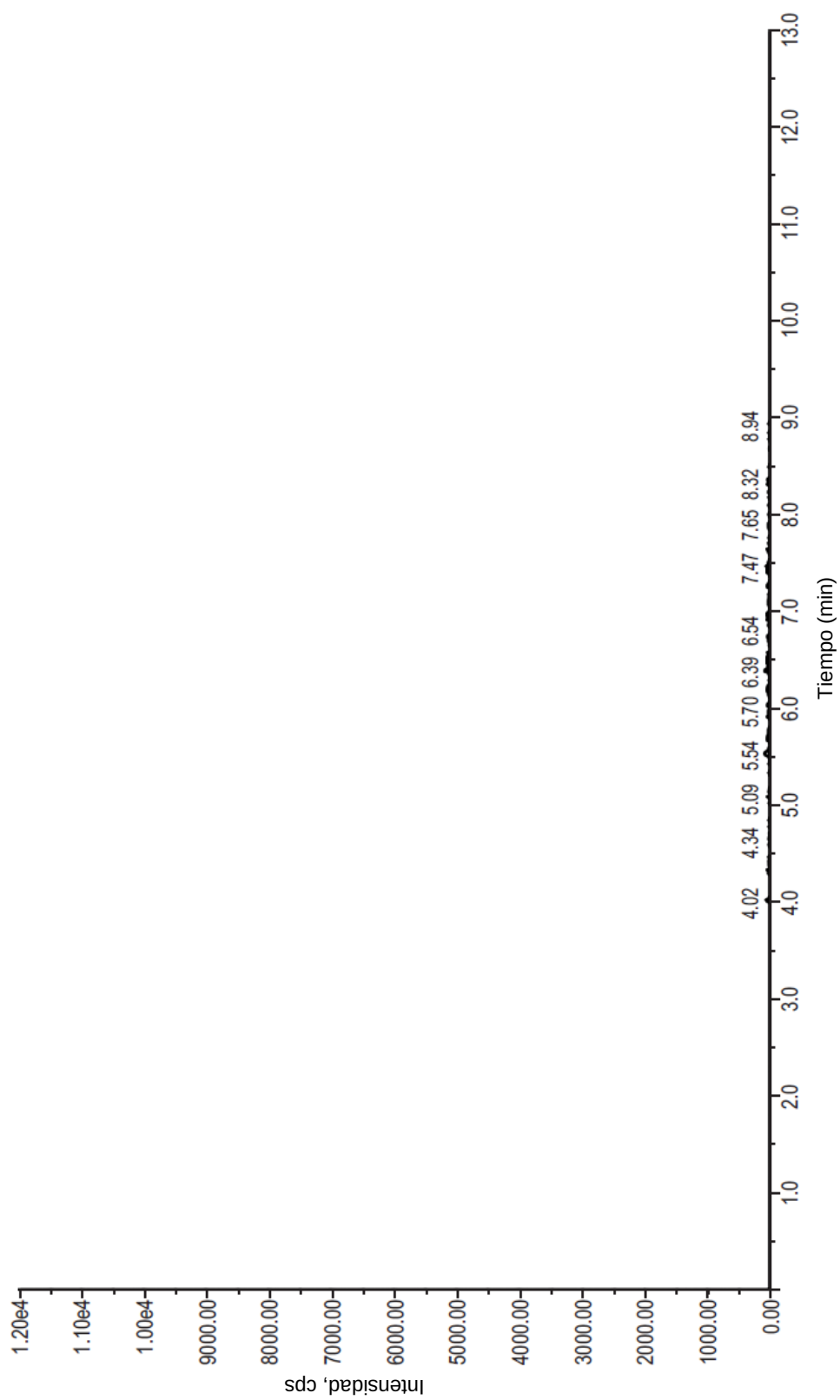


FIG. 22E

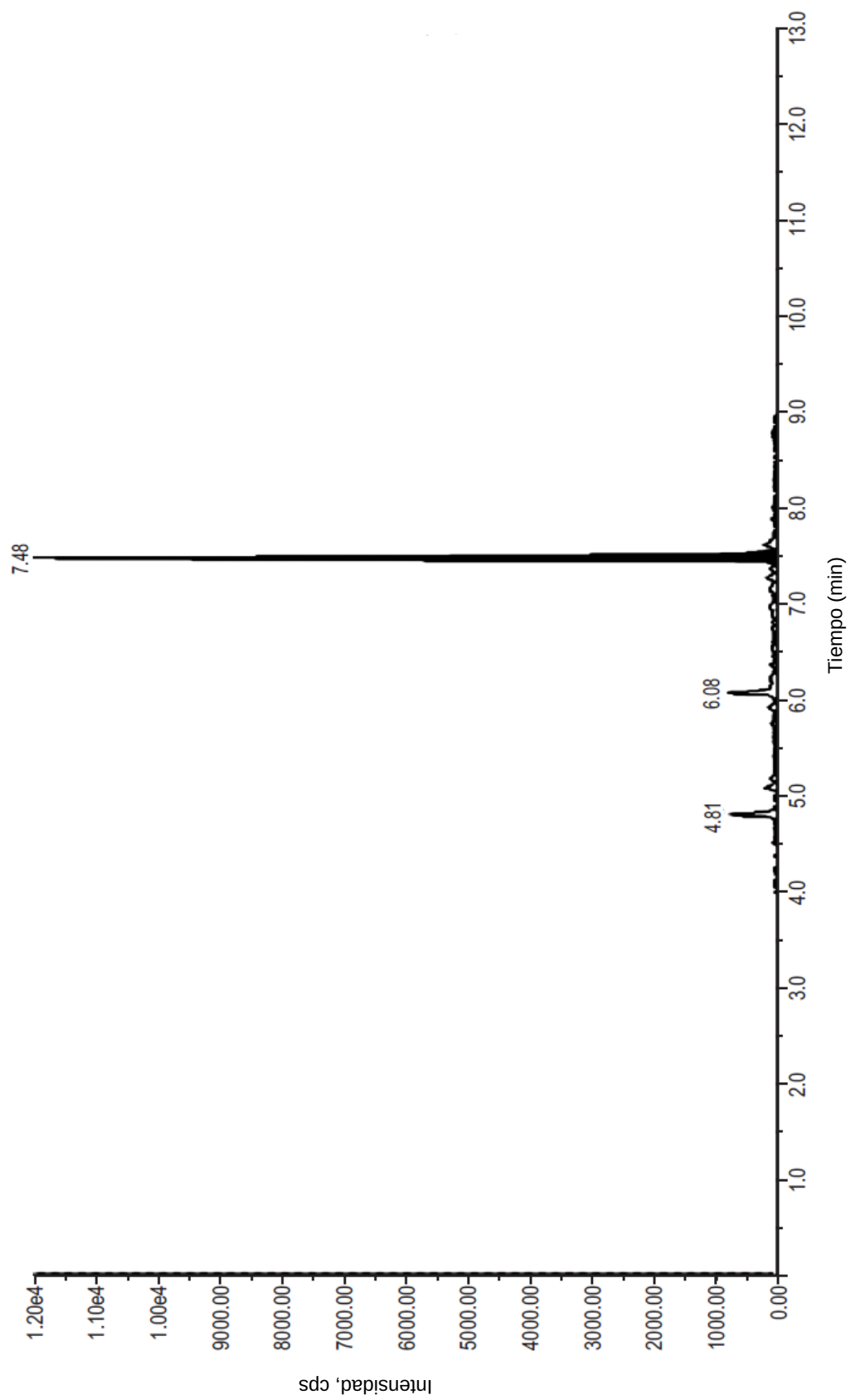


FIG. 22F