

REIVINDICACIONES

1. 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 que 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,

(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.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento peptídico no comprende una metionina (M) o cisteína (C).

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el fragmento peptídico no comprende una asparagina (N) seguida de una glicina (G) o serina (S).

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además purificar y concentrar la muestra digerida antes del análisis de espectrometría de masas.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la muestra digerida se purifica y se concentra mediante extracción en fase sólida (SPE).

6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la muestra digerida se purifica y se concentra a través de SISCAPA (patrones de isótopos estables y captura por anticuerpos antipeptidos).

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra es una muestra de sangre completa, una muestra de suero, una muestra de plasma o una muestra de tejido.

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la muestra es de un ratón, un primate no humano o un humano.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el primate no humano es un mono cynomolgus o un mono rhesus.

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la muestra se digiere con al menos una enzima.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde 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.

12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la espectrometría de masas es un análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de

masas en tándem (LC-MS/MS).

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el polipéptido comprende un dominio CH1, y en donde el dominio CH1 comprende la mutación diseñada por ingeniería genética.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el polipéptido comprende un dominio CH2, y en donde el dominio CH2 comprende la mutación diseñada por ingeniería genética.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el polipéptido comprende un dominio CH3, y en donde el dominio CH3 comprende la mutación diseñada por ingeniería genética.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la mutación diseñada 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.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde 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).

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la digestión produce un fragmento de péptido que comprende la secuencia de aminoácidos TTPVLDSGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7), DGSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 8), o GSFFLVSKLTVD (SEQ ID NO: 9).

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la muestra se digiere con tripsina, y en donde la digestión produce un fragmento de péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos TTPVLDSGSFFLVSK (SEC ID NO: 7).

20. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde 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).

21. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la muestra se digiere con Glu-C, y en donde la digestión produce un fragmento peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos GSFFLVSKLTVD (SEQ ID NO: 9).

22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la mutación diseñada por ingeniería genética en el dominio CH3 de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es N434S.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde 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).

25. El método de acuerdo con la reivindicación 23 o 24, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

26. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde el polipéptido que comprende la porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es un anticuerpo, una proteína de fusión Fc o una inmunoadhesina.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el polipéptido que comprende la porción de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es un anticuerpo.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

30. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo trispecífico o un anticuerpo multiespecífico.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el anticuerpo es un anticuerpo trispecífico.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el anticuerpo trispecífico comprende cuatro cadenas de polipéptidos 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: 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; C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina; C_{H1} es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina; C_{H2} y C_{H3} son dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina; 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 TTPPVLDSDGSFFLVSK (SEQ ID NO: 7), DGSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 8), o GSFFLVSKLTV (SEQ ID NO: 9).

33. El método de acuerdo con la reivindicación 32, en donde 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.

34. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33, en donde el anticuerpo se conjuga con un fármaco o una etiqueta.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el fármaco se selecciona de un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el marcador es un radioisótopo, un colorante fluorescente o una enzima.

37. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 36, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG humano.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1 humano o un anticuerpo IgG4 humano.

39. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32 y 34 a 38, en donde 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/MIP-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, DNGR-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.

40. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, en donde el método es para usarse 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.