

# BIOANÁLISIS DE ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS Y PRODUCTOS RELACIONADOS USANDO INMUNOPRECIPITACIÓN Y DETECCIÓN DE SCX-MS NATIVO

## REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 63/221,439, presentada el 13 de julio de 2021, que se incorpora a la presente mediante referencia.

## CAMPO

- 10 La invención se refiere de manera general a métodos para caracterizar anticuerpos y productos relacionados.

## ANTECEDENTES

- 15 Los péptidos o proteínas terapéuticos se expresan en una suspensión de cultivo celular para su producción. Posteriormente, se purifican los péptidos o proteínas para eliminar las impurezas relacionadas con el proceso. Los atributos sobre la calidad del producto de las proteínas o péptidos terapéuticos purificados se caracterizan exhaustivamente para garantizar la conservación de sus perfiles asociados de seguridad, eficacia y de vida útil que son pertinentes para la farmacocinética.

- 20 Las alteraciones de las proteínas o péptidos terapéuticos pueden darse en cualquier momento durante y luego del proceso de producción y/o purificación. Las proteínas o péptidos terapéuticos pueden volverse heterogéneos debido a diversas modificaciones postraduccionales, degradación de proteínas, modificaciones enzimáticas y modificaciones químicas. Estas alteraciones a las características biofísicas de los productos biofarmacéuticos pueden afectar la seguridad, la eficacia y la vida útil asociadas.

- 25 Otras características clave de un péptido o proteína terapéutica incluyen propiedades como farmacocinéticas y farmacodinámicas que determinan la abundancia y momento de la terapia in vivo. Entender el proceso de una terapia in vivo puede ser esencial para determinar cómo esa terapia se produce y suministra de mejor manera, por ejemplo, determinando rutas de administración, dosificación y efectos terapéuticos y adversos.

- 30 La evaluación precisa y eficaz de estas características de un péptido o proteína terapéuticos, a menudo en el contexto de una matriz compleja como el suero que complica la detección, requiere técnicas de alto rendimiento, alta sensibilidad y alta especificidad. Se apreciará que existe una necesidad para métodos y sistemas para lograr una caracterización y cuantificación certera de péptidos y proteínas terapéuticos y sus características clave.

## COMPENDIO

- 35 Un métodos de SCX-MS nativo se ha desarrollado para la detección y cuantificación de anticuerpos y productos relacionados. Se puede usar la inmunoprecipitación con microesferas de agarosa recubiertas en anticuerpo anti-Fc humano para extraer un anticuerpo humano en una muestra. Se puede usar la enzima de digestión IdeS o una variantes de esta para escindir

el anticuerpo inmovilizado, produciendo un fragmente Fab<sub>2</sub> que se puede eluir y recolectar. Entonces este fragmento puede someterse a análisis de SCX-MS nativo para cuantificación sensible y robusta. El método de la presente invención demostró cuantificar anticuerpos eficiente y certeramente, incluso en concentraciones bajas, en solución pura o en suero, como es demostrado por los Ejemplos.

La presente descripción proporciona un método para la caracterización de un anticuerpo. En algunas modalidades ilustrativas, el método comprende: (a) inmovilizar dicho anticuerpo en un sustrato de fase sólida; (b) poner en contacto dicho anticuerpo inmovilizado a una enzima de digestión para producir un fragmento no unido de dicho anticuerpo; (c) eluir dicho fragmento de anticuerpo; y (d) someter dicha elución a análisis de SCX-MS nativo para caracterizar a dicho anticuerpo.

En un aspecto, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal un anticuerpo biespecífico.

En un aspecto, dicha etapa inmovilizadora comprende poner en contacto una muestra que incluye dicho anticuerpo a un sustrato de etapa sólida capaz de unir a dicho anticuerpo. En un aspecto específico, dicha muestra es una muestra de suero.

En un aspecto, dicho sustrato de fase sólida comprende microesferas. En un aspecto específico, dichas microesferas son microesferas de agarosa o microesferas magnéticas.

En un aspecto específico, dicha unión de dicho sustrato de fase sólida se realiza por un anticuerpo adherido a dicho sustrato de fase sólida. En un aspecto adicional, dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-Fc.

En un aspecto, el método comprende además una etapa de lavar dicho sustrato de fase sólida después de inmovilizar a dicho anticuerpo.

En un aspecto, dicha enzima de digestión es IdeS o una variante de esta. En otro aspecto, dicho fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab<sub>2</sub>

En un aspecto, dicha elución comprende una etapa de centrifugar dicho sustrato de fase sólida y fragmento de anticuerpo.

En un aspecto, dicho sistema SCX se une a dicho espectrómetro de masas. En otro aspecto, dicho espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas de ionización por electrospray, espectrómetro de masas de ionización por nanoelectrospray, o espectrómetro de masas cuadropolo triple.

En un aspecto, dicha caracterización de un anticuerpo comprende la cuantificación de un anticuerpo, opcionalmente en donde dicha cuantificación se normaliza con respecto a un patrón interno.

Estos y otros aspectos de la invención se apreciarán y comprenderán mejor cuando se consideren conjuntamente con la siguiente descripción y los dibujos que la acompañan. La siguiente descripción, aunque indica varias modalidades y numerosos detalles específicos de

las mismas, se da a modo de ilustración y no de limitación. Pueden realizarse muchas sustituciones, modificaciones, adiciones o reorganizaciones dentro del alcance de la invención.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 ilustra un flujo de trabajo del método de la presente invención según una modalidad  
5 ilustrativa.

La Figura 2 muestra una comparación del rendimiento de diferentes columnas SCX en cromatogramas iónicos totales (TIC) SCX-MS para la separación de anticuerpos según una modalidad ilustrativa.

La Figura 3A muestra los TIC de SCX-MS para una serie de anticuerpos diferentes según una  
10 modalidad ilustrativa.

La Figura 3B muestra espectros de masas de mAb1 a concentraciones variables según una modalidad ilustrativa.

La Figura 3C muestra espectros de masas de mAb2 a concentraciones variables según una modalidad ilustrativa.

La Figura 4A muestra un SCX-MS TIC de mAb1 Fab<sub>2</sub> y el patrón interno mAb2 Fab<sub>2</sub> según una  
15 modalidad ilustrativa.

La Figura 4B muestra una linealidad de concentración mAb1 medida entre 20 pg y 20 ng en solución pura comparado a un estándar interno según una modalidad ilustrativa.

La Figura 4C muestra una linealidad de concentración mAb1 medida entre 20 ng y 2 µg en  
20 solución pura comparado a un estándar interno según una modalidad ilustrativa.

La Figura 4D muestra espectro de masas para mAb1 en concentraciones entre 20 pg y 2 µg en solución pura según una modalidad ilustrativa.

La Figura 5A muestra una linealidad de concentración mAb1 medida en suero cuando está normalizado a un estándar interno según una modalidad ilustrativa.

La Figura 5B muestra un inserto de la Figura 5A que ilustra una linealidad de la concentración  
25 medida de mAb1 a bajas concentraciones en suero según una modalidad ilustrativa.

La Figura 5C muestra un inserto de la Figura 5B que ilustra una linealidad de la concentración medida de mAb1 a bajas concentraciones en suero según una modalidad ilustrativa.

La Figura 6A muestra una linealidad de concentración mAb1 medida en suero sin  
30 normalización a un estándar interno según una modalidad ilustrativa.

La Figura 6B muestra un inserto de la Figura 6A que ilustra una linealidad de la concentración medida de mAb1 a bajas concentraciones en suero según una modalidad ilustrativa.

La Figura 6C muestra un inserto de la Figura 6B que ilustra una linealidad de la concentración medida de mAb1 a bajas concentraciones en suero según una modalidad ilustrativa.

La Figura 7A muestra un límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) de mAb1 en suero  
35 en un espectro de masas según una modalidad ilustrativa.

La Figura 7B muestra un límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés) de mAb1 en suero en un espectro de masas según una modalidad ilustrativa.

### **DESCRPCIÓN DETALLADA**

Las proteínas o los péptidos terapéuticos pueden volverse heterogéneos debido a diversas modificaciones postraduccionales (PTM, por sus siglas en inglés), degradación de proteínas, modificaciones enzimáticas y modificaciones químicas que se pueden introducir en cualquier momento durante y luego de la producción y la purificación de las proteínas o los péptidos. La identificación y la caracterización de las variantes heterogéneas son fundamentales para controlar los atributos de calidad de las características biofísicas de los productos

biofarmacéuticos. Existe la necesidad en la industria farmacéutica de que haya métodos analíticos rápidos, sensibles y de alto rendimiento para controlar y vigilar la producción y la purificación de las proteínas o los péptidos terapéuticos, tal como la producción de anticuerpos monoclonales o conjugados de anticuerpo y fármaco.

El procesamiento de un péptido terapéutico o proteína in vivo después de la administración determina además características como la eficacia y la seguridad del producto terapéutico.

Propiedades como la farmacocinética (FC) y la farmacodinámica (FD) de un péptido o proteína pueden no manifestarse hasta después de su administración. Adicionalmente, las modificaciones de un péptido o proteína terapéuticos pueden seguir produciéndose in vivo, dando lugar a productos de biotransformación que pueden no ser predecibles durante la fabricación. Por lo tanto, para comprender plenamente los atributos importantes de una terapia, se pueden analizar muestras biológicas, que presentan una mayor complejidad y desafíos para la caracterización y cuantificación sensible y específica de una proteína o péptido de interés.

El análisis de proteínas intactas basado en la espectrometría de masas por ionización de electrospray (ESI MS) se ha convertido en una herramienta esencial para la caracterización de proteínas terapéuticas durante su desarrollo. Lo más habitual es acoplar MS a la cromatografía líquida en fase reversa (RPLC) en condiciones desnaturizantes. Sin embargo, la sensibilidad de este método y la relación señal-ruido producida por la muestra compleja resultante con una amplia gama de estados de carga del analito tienen límites que pueden hacer que no sea fiable para la cuantificación precisa de anticuerpos de baja abundancia.

Recientemente, se han descrito sistemas LC-MS que comprenden cromatografía de intercambio iónico nativa acoplada en línea a ESI MS (Yan et al., 2020, J Am Soc Mass Spectrom, 31:2171-2179). El uso de la cromatografía de intercambio catiónico fuerte (SCX)-MS nativa ofrece una serie de ventajas para el análisis de anticuerpos terapéuticos en comparación con la RPLC-MS desnaturizante convencional. La SCX-MS nativa puede demostrar una alta sensibilidad y un amplio rango dinámico en comparación con la RPLC, y una capacidad superior para separar un analito diana de la matriz, como por ejemplo las proteínas séricas en una muestra de suero. Un perfil SCX-MS nativo también puede presentar una resolución

espacial MS superior, lo que facilita la detección de variantes de proteínas o productos de biotransformación.

Como se describe anteriormente, existe una necesidad para métodos sensibles para caracterizar y cuantificar proteínas y péptidos terapéuticos, como anticuerpos terapéuticos, en una muestra. Esta divulgación expone un novedoso método SCX-MS nativo para caracterizar un anticuerpo, adecuado para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos.

A menos que se disponga lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente les atribuye el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Si bien en la puesta en práctica o para la evaluación se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, a continuación, se describen métodos y materiales en particular.

Debe entenderse que el término "un/una" significa "al menos uno/una" y debe entenderse que las expresiones "aproximadamente" y "alrededor de" permiten la variación estándar tal como lo comprenderán los expertos en la técnica y cuando se proporcionen intervalos, se incluyen los valores extremos. Como se usa en la presente, los términos "incluye", "incluyen" e "incluyendo" pretenden ser no limitantes, y se entiende que significan "comprende", "comprenden" y "comprendiendo".

Tal como se usa en la presente, el término "proteína" o "proteína de interés" puede incluir cualquier polímero de aminoácido que tenga enlaces amida unidos covalentemente. Las proteínas comprenden una o más cadenas poliméricas de aminoácidos, generalmente conocidas en la técnica como "polipéptidos". "Polipéptido" se refiere a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos, variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos de origen no natural de estos unidos mediante enlaces peptídicos. "Péptido o polipéptido sintéticos" se refiere a un péptido o polipéptido de origen no natural. Los péptidos o polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante un sintetizador de polipéptidos automático. Los expertos en la técnica conocen varios métodos de síntesis de péptidos en fase sólida. Una proteína puede comprender uno o múltiples polipéptidos para formar una única biomolécula funcional. En otro aspecto ilustrativo, una proteína puede incluir fragmentos de anticuerpos, nanocuerpos, quimeras de anticuerpos recombinantes, citocinas, quimiocinas, hormonas peptídicas y similares. Las proteínas de interés pueden incluir cualquiera de las proteínas bioterapéuticas, proteínas recombinantes utilizadas en investigación o en terapia, proteínas Trap y otras proteínas de fusión del receptor quimérico Fc, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos y anticuerpos biespecíficos. Las proteínas se pueden producir usando sistemas de producción basados en células recombinantes, tales como el sistema de baculovirus de insectos, sistemas de levadura (*por ejemplo*, *Pichia* sp.), y sistemas de mamíferos (*por ejemplo*, células CHO y derivados de CHO como células CHO-K1). Para

acceder a una reseña reciente que describe proteínas bioterapéuticas y su producción, véase Ghaderi et ál., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation" (Darius Ghaderi et al., Production platforms for

biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28  
5 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147–176 (2012), the entire teachings of which are herein incorporated). En algunas modalidades ilustrativas, las proteínas

comprenden modificaciones, aductos y otros restos unidos covalentemente. Estas modificaciones, aductos y restos incluyen, por ejemplo, avidina, estreptavidina, biotina, glucanos (por ejemplo, N-acetilgalactosamina, galactosa, ácido neuramínico, N-

10 acetilglucosamina, fucosa, manosa y otros monosacáridos), PEG, polihistidina, epítipo FLAG, proteína de unión a maltosa (MBP), proteína de unión a quitina (CBP), glutatión-S-transferasa (GST) epítipo myc, marcadores fluorescentes y otros tintes, y similares. Las proteínas se

pueden clasificar sobre la base de la composición y la solubilidad y, por tanto, pueden incluir proteínas simples, tales como proteínas globulares y proteínas fibrosas; proteínas conjugadas,  
15 tales como nucleoproteínas, glicoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, fosfoproteínas, metaloproteínas y lipoproteínas; y proteínas derivadas, tales como proteínas derivadas primarias y proteínas derivadas secundarias.

En algunos ejemplos de modalidades, la proteína de interés puede ser una proteína recombinante, un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un  
20 fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, una proteína de fusión, scFv y combinaciones de estos.

Como se usa en la presente, el término "proteína recombinante" se refiere a una proteína producida como el resultado de una transcripción y traducción de un gen llevada a cabo en un vector de expresión recombinante que se ha introducido en una célula huésped adecuada. En  
25 determinadas modalidades ilustrativas, la proteína recombinante puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o totalmente humano. En determinadas modalidades ilustrativas, la proteína recombinante puede ser un anticuerpo de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en: IgG, IgM, IgA1, IgA2, IgD o IgE. En determinadas modalidades ilustrativas, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa (por  
30 ejemplo, una IgG1) o, alternativamente, el anticuerpo puede ser un fragmento (por ejemplo, un fragmento Fc o un fragmento Fab).

El término "anticuerpo", como se usa en la presente, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de estos (p. ej., IgM). Cada  
35 cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende

una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (CL1). Las regiones VH y VL también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). Cada VH y VL incluye típicamente tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En diferentes modalidades de la invención, las FR del anticuerpo anti-big- ET -1 (o de la porción de unión al antígeno de este) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana o pueden ser modificadas de forma natural o artificial. Se puede definir una secuencia de consenso de aminoácidos basándose en un análisis en paralelo de dos o más CDR. El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente, también incluye fragmentos de unión al antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo, «fragmento de unión al antígeno» de un anticuerpo y similares, tal como se usan en la presente, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, que puede obtenerse enzimáticamente, sintético o genéticamente modificado que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas mediante cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de modificación genética recombinante que implican la manipulación y la expresión del ADN que codifica los dominios variables y opcionalmente constantes de los anticuerpos. Dicho ADN se conoce y/o se encuentra fácilmente disponible en, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (que incluyen, por ejemplo, bibliotecas de anticuerpos-fagos), o puede sintetizarse. Es posible secuenciar y manipular el ADN químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para ordenar uno o más dominios constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc. Tal como se usa en la presente, un «fragmento de anticuerpo» incluye una parte de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región de unión al antígeno o variable de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub> (o "Fab<sub>2</sub>"), un fragmento scFv, un fragmento Fv, un díacuerpo dsFv, un fragmento dAb, un fragmento Fd', un fragmento Fd y una región aislada de la región determinante de complementariedad (CDR), así como triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos Fv son la combinación de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, y las proteínas ScFv son moléculas polipeptídicas de cadena sencilla recombinante en las que las regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina están conectadas por un

conector peptídico. En algunas modalidades ilustrativas, un fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos suficiente del anticuerpo original del que es un fragmento que se une al mismo antígeno que el anticuerpo original; en algunas modalidades ilustrativas, un fragmento se une al antígeno con una afinidad comparable a la del anticuerpo original y/o compite con el anticuerpo original para unirse al antígeno. Un fragmento de anticuerpo puede producirse mediante cualquier medio. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente mediante fragmentación de un anticuerpo intacto y/o puede producirse por medios recombinantes a partir de un gen que codifica la secuencia parcial del anticuerpo. En algunas modalidades ilustrativas, un fragmento de anticuerpo se puede producir por digestión con la enzima de digestión IdeS o una variante de esta. De manera alternativa o adicional, un fragmento de anticuerpo puede producirse por medios total o parcialmente sintéticos. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo de cadena simple. De manera alternativa o adicional, un fragmento de anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que están unidas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular. Un fragmento de anticuerpo funcional típicamente comprende al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más típicamente comprende al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

El término "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas diferentes con cada cadena pesada uniéndose específicamente a un epítipo diferente, ya sea en dos moléculas diferentes (por ejemplo, antígenos) o en la misma molécula (por ejemplo, en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítopos diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítipo será generalmente de al menos uno a dos o tres o cuatro órdenes de magnitud inferior a la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítipo, y viceversa. Los epítopos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma diana o en una diana diferente (p. ej., en la misma proteína o en una diferente). Los anticuerpos biespecíficos se pueden hacer, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconocen diferentes epítopos del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítopos del mismo antígeno pueden fusionarse con secuencias de ácido nucleico que codifican diferentes regiones constantes de cadena pesada y dichas secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina.

Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una con tres CDR de cadena pesada, seguidas de un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que o bien no confiere especificidad de unión a

antígeno pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más de los epítomos unidos por las regiones de unión a antígeno de la cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y permitir la unión de una o ambas cadenas pesadas a uno o ambos epítomos. Los BsAbs

5 pueden dividirse en dos clases principales, los que llevan una región Fc (similar a IgG) y los que carecen de región Fc, siendo estos últimos normalmente más pequeños que las moléculas biespecíficas IgG y similar a IgG que comprenden un Fc. Los bsAbs de tipo IgG pueden tener diferentes formatos como, entre otros, triomab, botones en ojales IgG (kih IgG), crossMab, orth-Fab IgG, dominios de variable dual Ig (DVD-Ig), Fab (DAF) dos en uno o de acción dual, IgG

10 monocatenario Fv (IgG-scFv), o cuerpos  $\kappa\lambda$ . Los formatos diferentes no IgG incluyen scFv en tándem, formato diacuerpo, diacuerpo de cadena simple, diacuerpos en tándem (TandAbs), molécula de rediana de afinidad dual (DART), DART-Fc, nanocuerpos o anticuerpos producidos por el método dock-and-lock (DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne

15 Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265-310 (2014), cuyas enseñanzas íntegras se incorporan al presente documento). Los métodos de producción de bsAb no se limitan a la tecnología de cuadromas basada en la fusión somática de dos líneas celulares de hibridomas diferentes, la conjugación química, que involucra reticuladores químicos, y enfoques genéticos que utilizan tecnología de

20 ADN recombinante. Los ejemplos de bsAb incluyen aquellos descritos en las siguientes solicitudes de patentes, que se incorporan a la presente mediante referencia: U.S. Ser. n.º 12/823838, presentada el 25 de junio de 2010; U.S. Ser. n.º 13/ 488628, presentada el 5 de junio de 2012; U.S. Ser. n.º 14/031075, presentada el 19 de septiembre de 2013; U.S. Ser. n.º 14/808171, presentada el 24 de julio de 2015; U.S. Ser. n.º 15/713574, presentada el 22 de

25 septiembre de 2017; U.S. Ser. n.º 15/713569, presentada el 22 de septiembre de 2017; U.S. Ser. n.º 15/386453, presentada el 21 de diciembre de 2016; U.S. Ser. n.º 15/386443, presentada el 21 de diciembre de 2016; U.S. Ser. n.º 15/22343, presentada el 29 de julio de 2016, y U.S. Ser. n.º 15814095, presentada el 15 de noviembre de 2017.

Como se usa en la presente, "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo sin

30 especificidades de unión para al menos dos antígenos distintos. Aunque tales moléculas normalmente sólo se unen a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, bsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales como el anticuerpo trispecífico y el KIH Trispecific también pueden abordarse mediante el sistema y el método aquí divulgados.

Como se utiliza en la presente, el término «anticuerpo monoclonal» no se limita a los

35 anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. Un anticuerpo monoclonal puede derivarse de un solo clon, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o fago, por cualquier medio disponible o que se conozca en la técnica. Los anticuerpos monoclonales útiles en la

presente descripción pueden prepararse mediante el uso de una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de expresión en fagos, o una combinación de estas.

En algunas modalidades ilustrativas, la proteína de interés puede producirse por células

5 mamíferas. Las células mamíferas pueden ser de origen humano o no humano, pueden incluir células epiteliales primarias (por ejemplo queratinocitos, células epiteliales cervicales, células epiteliales bronquiales, células epiteliales traqueales, células epiteliales renales y células epiteliales retinales), líneas celulares establecidas y sus cepas (por ejemplo, células renales embriónicas 293, células BHK, células epiteliales cervicales HeLa y células retinales PER-6, 10 Células MDBK (NBL-1), células 911, células CRFK, células MDCK, células CHO, células BeWo, células Chang, células Detroit 562, células HeLa 229, células HeLa S3, células Hep-2, células KB, células LSI80, células LS174T, células NCI-H-548, células RPMI2650, células SW-13, células T24, WI-28 VA13, células 2RA, células WISH, células BS-C-I, células LLC-MK2, células Clone M-3, células 1-10, células RAG, células TCMK-1, células Y-I, células LLC-PKi, 15 células PK(15), células GHi, células GH3, células L2, células LLC-RC 256, células MHiCi, células XC, células MDOK, células VSW, y células TH-I, células B1, células BSC-1, células RAf, células RK, células PK-15 o derivados de las mismas), células de fibroblastos de cualquier tejido u órgano (incluidos, entre otros, corazón, hígado, riñón, colon, intestinos, esófago, estómago, tejido neural (cerebro, médula espinal), pulmón, tejido vascular (arteria, vena, 20 capilar), tejido linfóide (glándula linfática, adenoides, amígdala, médula ósea y sangre), bazo, y líneas celulares de fibroblastos y fibroblastos similares (por ej. g., células CHO, células TRG-2, células IMR-33, células Don, células GHK-21, células de citrulinemia, células Dempsey, células Detroit 551, células Detroit 510, células Detroit 525, células Detroit 529, células Detroit 532, células Detroit 539, células Detroit 548, células Detroit 573, células HEL 299, células IMR-90, 25 células MRC-5, células WI-38, células WI-26, células Midi, células CHO, células CV-1, células COS-1, células COS-3, células COS-7, células Vero, células DBS-FrhL-2, células BALB/3T3, células F9, células SV-T2, células M-MSV-BALB/3T3, células K-BALB, células BLO-11, células NOR-10, células C3H/IOTI/2, células HSDMiC3, células KLN205, células McCoy, células de ratón L, células de la cepa 2071 (ratón L), células de la cepa L-M (Ratón L), células L-MTK' 30 (Ratón L), clones NCTC 2472 y 2555, células SCC-PSA1, células Swiss/3T3, células Indian muntjac, células SIRC, células Cn, y células Jensen, células Sp2/0, NS0, NS1 o derivados de las mismas).

Tal como se utiliza en la presente, la "muestra" puede obtenerse de cualquier etapa del bioproceso, como el fluido de cultivo celular (CCF, por sus siglas en inglés), el fluido de cultivo 35 celular cosechado (HCCF, por sus siglas en inglés), cualquier etapa del proceso posterior, la sustancia farmacológica (DS, por sus siglas en inglés) o un producto farmacológico (DP, por sus siglas en inglés) que comprenda el producto formulado final. En algunas otras modalidades

ilustrativas específicas, la muestra puede seleccionarse de cualquier etapa del proceso posterior de clarificación, producción cromatográfica, inactivación viral o filtración. En algunas modalidades ilustrativas específicas, el producto farmacéutico puede seleccionarse de un producto farmacéutico fabricado en la clínica, envío, almacenamiento o manipulación.

- 5 Una muestra también puede tomarse de un sujeto antes y/o después de la administración de un péptido o proteína terapéuticos, en cuyo caso puede ser una "muestra biológica" o "muestra PK". Una muestra biológica puede ser, por ejemplo, una muestra de tejido, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de saliva o una muestra de orina. En una modalidad ilustrativa, se toma una muestra de suero de un sujeto para caracterizar y/o
- 10 cuantificar una proteína de interés tras su administración. En algunas modalidades ilustrativas, se toma una muestra biológica de un ratón.

Tal como se usa en la presente, el término "impureza" puede incluir cualquier proteína indeseable presente en el producto biofarmacéutico de proteína. La impureza puede incluir impurezas relacionadas con el proceso y con el producto. La impureza puede ser además de

15 estructura conocida, parcialmente caracterizada, o no identificada. Las impurezas relacionadas con el proceso pueden derivarse del proceso de fabricación y pueden incluir las tres categorías principales: derivadas del sustrato celular, derivadas del cultivo celular y derivadas en etapa posterior. Las impurezas derivadas del sustrato celular incluyen, de modo no taxativo, proteínas derivadas del organismo hospedador y ácido nucleico (ADN total, vector o genómico de la

20 célula hospedadora). Las impurezas derivadas del cultivo celular incluyen, de modo no taxativo, inductores, antibióticos, suero y otros componentes de los medios. Las impurezas derivadas posteriormente incluyen, de modo no taxativo, enzimas, reactivos de procesamiento químico y bioquímico (p. ej., bromuro de cianógeno, guanidina, agentes oxidantes y reductores), sales inorgánicas (p. ej., metales pesados, arsénico, iones no metálicos), solventes, portadores,

25 ligandos (p. ej., anticuerpos monoclonales) y otras sustancias lixiviables. Las impurezas relacionadas con el producto (p. ej., precursores, determinados productos de degradación) pueden ser variantes moleculares que surgen durante la fabricación y/o el almacenamiento y que no tienen propiedades comparables a las del producto deseado en cuanto a actividad, eficacia y seguridad. Tales variantes pueden requerir un esfuerzo considerable en aislamiento y

30 caracterización para identificar el tipo de modificación o modificaciones. Las impurezas relacionadas con el producto pueden incluir formas truncadas, formas modificadas y agregados. Las formas truncadas están formadas por enzimas hidrolíticas o sustancias químicas que catalizan la escisión de enlaces peptídicos. Las formas modificadas incluyen, entre otras, formas conjugadas alteradas (p. ej., glicosilación, fosforilación), desamidadas,

35 isomerizadas, S-S enlazadas con emparejamiento incorrecto u oxidadas. Las formas modificadas también pueden incluir cualquier forma de modificación postraduccional. Los agregados incluyen dímeros y múltiplos más altos del producto deseado. (Especificaciones

Q6B: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH agosto de 1999, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos).

Tal como se usa en la presente, la expresión general "modificaciones postraduccionales" o "PTM" se refiere a modificaciones covalentes que experimentan los polipéptidos, ya sea

- 5 durante (modificación cotraduccional) o después (modificación postraducciona) de su síntesis ribosómica. Las PTM generalmente se introducen mediante enzimas específicas o vías enzimáticas. Muchas se producen en el sitio de una secuencia de proteína característica específica (secuencia distintiva) dentro de la cadena principal de la proteína. Se han registrado varios cientos de PTM y estas modificaciones influyen invariablemente en algún aspecto de la
- 10 estructura o función de una proteína (Walsh, G. «Proteins» (2014) segunda edición, publicada por Wiley and Sons, ISBN: 9780470669853). Las diversas modificaciones postraduccionales incluyen, de modo no taxativo, escisión, extensiones terminales del extremo N, degradación de proteínas, acilación del extremo N, biotinilación (acilación de residuos de lisina con una biotina), amidación terminal del extremo C, glucosilación, yodación, unión covalente de grupos
- 15 prostéticos, acetilación (la adición de un grupo acetilo, generalmente en el extremo N de la proteína), alquilación (la adición de un grupo alquilo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo) generalmente en residuos de arginina o lisina), metilación, adenilación, ADP-ribosilación, enlaces cruzados covalentes entre, o dentro de, cadenas polipeptídicas, sulfonación, prenilación, modificaciones dependientes de vitamina C (hidroxilaciones de prolina y lisina y
- 20 amidación carboxiterminal), modificación dependiente de vitamina K en donde la vitamina K es un cofactor en la carboxilación de residuos de ácido glutámico que da como resultado la formación de un  $\gamma$ -carboxiglutamato (un residuo glu), glutamilación (enlace covalente de residuos de ácido glutámico), glicilación (residuos de glicina de enlace covalente), glicosilación (adición de un grupo glicosilo a asparagina, hidroxilisina, serina o treonina, lo cual da como
- 25 resultado una glicoproteína), isoprenilación (adición de un grupo isoprenoide como farnesol y geranilgeraniol), lipoilación (unión de una funcionalidad lipoato), fosfopanteteinilación (adición de un resto 4'-fosfopanteteinil de la coenzima A, como en la biosíntesis de ácidos grasos, policétidos, péptidos no ribosomales y leucina), fosforilación (adición de un grupo fosfato, generalmente a serina, tirosina, treonina o histidina) y sulfatación (adición de un grupo sulfato,
- 30 generalmente a un residuo de tirosina). Las modificaciones postraduccionales que cambian la naturaleza química de los aminoácidos incluyen, entre otras, la citrulinación (la conversión de arginina en citrulina mediante desiminación) y la desaminación (la conversión de glutamina en ácido glutámico o asparagina en ácido aspártico). Las modificaciones postraduccionales que implican cambios estructurales incluyen, entre otras, la formación de puentes disulfuro (enlace covalente de dos aminoácidos de cisteína) y la escisión proteolítica (escisión de una proteína
- 35 en un enlace peptídico). Determinadas modificaciones postraduccionales implican la adición de otras proteínas o péptidos, tales como ISGilación (enlace covalente a la proteína ISG15 (gen

estimulado por interferón, por sus siglas en inglés)), SUMOilación (enlace covalente a la proteína SUMO (pequeño modificador relacionado con la ubiquitina, por sus siglas en inglés)) y ubiquitinación (enlace covalente a la proteína ubiquitina). Ver European Bioinformatics Institute Protein Information ResourceSIB Swiss Institute of Bioinformatics, European Bioinformatics Institute Drs - Drosomycin precursor - Drosophila melanogaster (Fruit fly) - Drs gene & protein, <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist> (visitado por última vez el 15 de enero de 2019) para obtener un vocabulario controlado más detallado de las PTM seleccionadas por UniProt.

Las modificaciones postraduccionales, variantes de carga o variantes de tamaño de un péptido o proteína terapéuticos pueden surgir en cualquier momento durante la producción, fabricación, almacenamiento, suministro o administración de un péptido o proteína terapéuticos. Las modificaciones adicionales a un péptido o proteína pueden ocurrir in vivo después de la administración a un sujeto en un proceso conocido como "biotransformación". Los productos de biotransformación pueden tener propiedades modificadas en comparación con un terapéutico de preadministración. La biotransformación a menudo conduce a una reducción en el tamaño de un terapéutico, de modo que pueden preferirse métodos de detección con mayor sensibilidad para analitos más pequeños. En algunas modalidades ilustrativas, el método de la presente invención presenta una alta sensibilidad para los productos de biotransformación de una proteína de interés.

En algunas modalidades ilustrativas, el método para caracterizar y/o cuantificar una proteína de interés puede comprender opcionalmente enriquecer una proteína de interés en la matriz de muestra usando inmunoprecipitación (IP). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inmunoprecipitación" puede incluir un proceso de precipitación de un antígeno proteico a partir de una solución utilizando un anticuerpo que se une específicamente a esa proteína en particular. La inmunoprecipitación puede ser directa, en la que los anticuerpos de la proteína diana se inmovilizan en un sustrato de fase sólida, o indirecta, en la que los anticuerpos libres se añaden a la mezcla de proteínas y posteriormente se capturan con, por ejemplo, microesferas de proteína A/G.

En algunas modalidades ilustrativas, el sustrato en fase sólida puede estar formado por microesferas, por ejemplo microesferas de agarosa o microesferas magnéticas. Las microesferas pueden estar recubiertas de estreptavidina para facilitar la adherencia a un anticuerpo. Un anticuerpo de "captura" biotinilado puede ponerse en contacto con las microesferas recubiertas de estreptavidina, adhiriéndose a las microesferas y formando "microesferas de inmunoprecipitación" capaces de unirse al antígeno del anticuerpo adherido. En algunas modalidades ilustrativas, el anticuerpo de captura adherido puede ser un anticuerpo anti-Fc, y puede ser específicamente un anticuerpo anti-Fc humano.

Un anticuerpo anti-Fc humano se unirá preferentemente al dominio Fc de cualquier anticuerpo humano, tal como por ejemplo un anticuerpo terapéutico, y por lo tanto ser usado para

inmunoprecipitar u "obtener" un anticuerpo terapéutico de una muestra, permitiendo que se enriquezca para el análisis. Tras la inmunoprecipitación de un anticuerpo terapéutico, puede ponerse en contacto una enzima digestiva con la mezcla de inmunoprecipitación para escindir el anticuerpo terapéutico y liberar fragmentos de anticuerpo que pueden eluirse para su

posterior análisis. En una modalidad ilustrativa, IdeS o sus variantes se utilizan como enzima digestiva. La escisión de IdeS produce dos fragmentos de anticuerpo: un fragmento Fc y un fragmento Fab<sub>2</sub>. Cuando el dominio Fc de un anticuerpo terapéutico está unido a un anticuerpo de captura anti-Fc humano, la escisión con IdeS dará lugar a la liberación de un fragmento Fab<sub>2</sub> no unido, que puede eluirse para su posterior análisis. En una modalidad ilustrativa, los fragmentos Fab<sub>2</sub> eluidos se someten a análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas, en particular SCX-MS nativa.

Como se usa en este documento, el término "digestión" se refiere a la hidrólisis de uno o más enlaces peptídicos de una proteína. Existen varios enfoques para llevar a cabo la digestión de una proteína en una muestra mediante el uso de un agente hidrolizante apropiado, por ejemplo, digestión enzimática o digestión no enzimática.

Como se usa en este documento, el término "enzima de digestión" se refiere a uno cualquiera de un gran número de agentes diferentes que pueden realizar la digestión de una proteína.

Ejemplos no taxativos de agentes hidrolizantes que pueden llevar a cabo digestión enzimática incluyen proteasa de *Aspergillus Saitoi*, elastasa, subtilisina, proteasa XIII, pepsina, tripsina,

Tryp-N, quimotripsina, aspergillopepsina I, proteasa LysN (Lys-N), endoproteinasa LysC (Lys-C), endoproteinasa Asp-N (Asp-N), endoproteinasa Arg-C (Arg-C), endoproteinasa Glu-C (Glu-C) o proteína de membrana externa T (OmpT), enzima degradadora de inmunoglobulina de *Streptococcus pyogenes* (IdeS), termolisina, papaína, pronasa, proteasa V8 o fragmentos biológicamente activos u homólogos de las mismas o combinaciones de los mismos. Para una revisión reciente donde se discuten las técnicas disponibles para la digestión de proteínas ver Switazar et al., "Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments" (Linda Switazar, Martin Giera & Wilfried M. A. Niessen, Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments, 12 JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH 1067–1077 (2013)).

En algunas modalidades ilustrativas, IdeS o una variante de esta se usa para escindir un anticuerpo debajo de la región bisagra, produciendo un fragmento Fc y un fragmento Fab<sub>2</sub>. La digestión de un analito puede ser ventajosa porque la reducción de tamaño puede aumentar la sensibilidad y especificidad de la caracterización y detección del analito mediante LC-MS.

Cuando se utiliza con este fin, puede ser preferible una digestión que separe un fragmento Fc y mantenga un fragmento Fab<sub>2</sub> para el análisis. Esto se debe a que las regiones variables de interés, como la región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo, están contenidas en el fragmento Fab<sub>2</sub>, mientras que el fragmento Fc puede ser relativamente

uniforme entre anticuerpos y, por tanto, proporcionar información menos relevante. Además, la digestión IdeS tiene una alta eficiencia, lo que permite una alta recuperación de un analito. El proceso de digestión y elución puede realizarse en condiciones nativas, lo que permite un acoplamiento sencillo a un sistema LC-MS nativo.

- 5 Los IdeS o sus variantes están disponibles comercialmente y pueden comercializarse, por ejemplo, como FabRICATOR® o FabRICATOR Z®.

Como se usa en la presente, el término "cromatografía líquida" se refiere a un proceso en el que una mezcla biológica/química transportada por un líquido puede separarse en componentes como resultado de la distribución diferencial de los componentes a medida que  
10 fluyen a través (o dentro) de una fase sólida o líquida estacionaria. Ejemplos no taxativos de cromatografía líquida incluyen cromatografía líquida de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de interacción hidrofílica o cromatografía de modo mixto.

- 15 En algunas modalidades ilustrativas, el método para caracterizar y/o cuantificar una proteína de interés puede incluir el uso de cromatografía de intercambio catiónico fuerte (SCX). La cromatografía de intercambio catiónico es un subconjunto de cromatografía de intercambio que usa una fase estacionaria que presenta un grupo funcional cargado negativamente para capturar analitos cargados positivamente. El pH del amortiguador de cromatografía puede  
20 ajustarse gradualmente para liberar y eluir los analitos para pl.

La cromatografía de intercambio catiónico usa un "material de cromatografía de intercambio catiónico". La cromatografía de intercambio catiónico puede además subdividirse en, por ejemplo, intercambio catiónico fuerte (SCX) o intercambio catiónico débil, dependiendo del material de cromatografía de intercambio catiónico utilizado. Los materiales de cromatografía  
25 de intercambio catiónico con un grupo de ácido sulfónico (S) se pueden usar en intercambiadores catiónicos fuertes, mientras que los materiales de cromatografía de intercambio catiónico con un grupo carboximetilo (CM) se pueden usar en intercambiadores catiónicos débiles. Los intercambiadores catiónicos fuertes incluyen, por ejemplo, SOURCES, que usa un grupo funcional de sulfato de metilo y SP Sepharose, que usa un grupo funcional  
30 de sulfopropilo. Los intercambiadores catiónicos débiles incluyen, por ejemplo, Cm-celulosa, que usa un grupo funcional de carboximetilo. Se puede preferir SCX porque se puede usar un rango más amplio de amortiguadores pH sin perder la carga del intercambiador catiónico fuerte, permitiendo una separación efectiva de los analitos con un amplio rango pl.

Los "materiales de cromatografía de intercambio catiónico" están disponibles bajo diferentes  
35 nombres de una multitud de empresas como, por ejemplo, Bio-Rex, Macro-Prep CM (disponible en BioRad Laboratories, Hercules, Calif., EE.UU.), intercambiador catiónico débil WCX 2 (disponible en Ciphergen, Fremont, Calif., EE.UU.), Dowex MAC-3 (disponible en Dow chemical

company, Midland, Mich, EE. UU.), Mustang C (disponible en Pall Corporation, East Hills, N.Y., EE. UU.), Cellulose CM-23, CM-32, CM-52, hyper-D, and partisphere (disponibles en Whatman plc, Brentford, UK), Amberlite IRC 76, IRC 747, IRC 748, GT 73 (disponibles en Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemania), CM 1500, CM 3000 (disponibles en BioChrom Labs, Terre Haute, Ind., EE. UU.) y CM-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Life Sciences, Alemania). Además, las resinas de intercambio catiónico disponibles en el mercado incluyen carboximetilcelulosa, Bakerbond ABX, sulfopropil (SP) inmovilizado en agarosa (por ejemplo, SP-Sepharose Fast Flow o SP-Sepharose High Performance, disponibles en GE Healthcare-Amersham Biosciences Europe GmbH, Friburgo, Alemania) y sulfonil inmovilizado en agarosa (por ejemplo, S-Sepharose Fast Flow disponible en GE Healthcare, Life Sciences, Alemania).

Los materiales de cromatografía de intercambio catiónico incluyen materiales de cromatografía de modo mixto que combinan tecnologías de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica (por ejemplo, Capto Adhere, Capto MMC, MEP HyperCell, Eshmuno HCX, etc.), materiales de cromatografía de modo mixto que combinan tecnologías de intercambio aniónico y de intercambio catiónico (por ejemplo, hidroxiapatita, hidroxiapatita cerámica, etc.), y similares. Los materiales de cromatografía de intercambio catiónico que pueden utilizarse en la cromatografía de intercambio catiónico en la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, todos los materiales de cromatografía de intercambio catiónico disponibles comercialmente como se ha descrito anteriormente.

Mientras que el RPLC-MS desnaturalizante es una técnica convencional en la caracterización de proteínas terapéuticas, el SCX-MS nativo puede proporcionar ventajas analíticas como se describe en la presente. Por ejemplo, el SCX-MS nativo puede proporcionar sensibilidad y especificidad de detección. En casos donde los límites de detección de RPLC y SCX son comparables, el SCX puede proporcionar calidad de datos superior y una relación señal-ruido más alta. El SCX puede tener una habilidad mejorar para separar un analito diana de una matriz de proteína, por ejemplo, en una muestra de suero, y adicionalmente puede tener una habilidad mejorada para separar productos de biotransformación de una proteína de interés. Por lo tanto, la cromatografía preferida para el método de la presente invención es SCX nativo, y en la presente se divulga un método novedoso de caracterizar y/o cuantificar una proteína de interés usando SCX nativo.

Tal como se usa en la presente, la expresión “espectrómetro de masas” incluye un dispositivo capaz de identificar especies moleculares específicas y medir sus masas con precisión. El término pretende incluir cualquier detector molecular en el que se pueda caracterizar un polipéptido o péptido. Un espectrómetro de masas puede incluir tres partes principales: la fuente de iones, el analizador de masas y el detector. El papel de la fuente de iones es crear iones en fase gaseosa. Los átomos, moléculas o grupos de analitos pueden transferirse a la fase gaseosa y ionizarse simultáneamente (como en la ionización por electronebulización) o a

través de procesos separados. La elección de la fuente de iones depende en la aplicación. En algunas modalidades ilustrativas, el espectrómetro de masas puede ser un espectrómetro de masas en tándem. Como se usa en la presente, el término "espectrometría de masas en tándem" incluye una técnica en la que se obtiene información estructural sobre las moléculas de muestra mediante el uso de múltiples etapas de selección de masas y separación de masas. Un requisito previo es que las moléculas de muestra se transformen en una fase gaseosa e ionizarse para que se formen fragmentos en una manera predecible y controlable después de la primera etapa de selección en masa. La MS/MS multietapa, o  $MS^n$  se puede llevar a cabo primero seleccionando y aislando un ion precursor ( $MS^2$ ), fragmentándolo, aislando un ion del fragmento primario ( $MS^3$ ), fragmentándolo, aislando un fragmento secundario ( $MS^4$ ), y así sucesivamente siempre que se pueda obtener información significativa o la señal del ión del fragmento sea detectable. La MS en tándem se ha realizado con éxito con una amplia variedad de combinaciones de analizadores. Cuáles analizadores a combinar para una determinada aplicación se pueden determinar por muchos factores diferentes, tales como la sensibilidad, la selectividad y la velocidad, pero también el tamaño, el costo y la disponibilidad. Las dos categorías principales de métodos de MS en tándem son en tándem en el espacio y en tándem en el tiempo, pero también hay híbridos en los que los analizadores en tándem en el tiempo se acoplan en el espacio o con analizadores en tándem en el espacio. Un espectrómetro de masas en tándem en el espacio comprende una fuente de iones, un dispositivo de activación de iones precursores y al menos dos analizadores de masas que no atrapan. Pueden diseñarse funciones de separación de  $m/z$  específicas de modo que en una sección del instrumento se seleccionen iones, se disocian en una región intermedia y los iones producto se transmitan luego a otro analizador para separación  $m/z$  y adquisición de datos. En el espectrómetro de masas en tándem en el tiempo, los iones producidos en la fuente de iones pueden atraparse, aislarse, fragmentarse y separarse por  $m/z$  en el mismo dispositivo físico. Los péptidos identificados por el espectrómetro de masas pueden usarse como representantes sustitutos de la proteína intacta y sus modificaciones postraduccionales. Se pueden utilizar para la caracterización de proteínas al correlacionar datos de MS/MS experimentales y teóricos, estos último generados a partir de posibles péptidos en una base de datos de secuencias de proteínas. La caracterización incluye, de modo no taxativo, secuenciar aminoácidos de los fragmentos de proteínas, determinar la secuenciación de proteínas, determinar la secuenciación de novo de proteínas, localizar modificaciones postraduccionales o identificar modificaciones postraduccionales, análisis de comparabilidad o combinaciones de estos.

En algunos aspectos ilustrativos, el espectrómetro de masas puede funcionar usando nanoelectrospray o nanospray.

El término “nanoelectropulverización” o “nanopulverización”, tal como se usa en este la presente, se refiere a la ionización por electropulverización a una velocidad de flujo de solvente muy baja, típicamente cientos de nanolitros por minuto de solución de muestra o menos, a menudo sin el uso de un suministro de solvente externo. La configuración de infusión de electrospray que forma un nanoelectrospray puede utilizar un emisor de nanoelectrospray estático o un emisor de nanoelectrospray dinámico. Un emisor de nanoelectrospray estático realiza un análisis continuo de volúmenes bajos de solución de muestra (analito) durante un período de tiempo prolongado. Un emisor de nanoelectrospray dinámico utiliza una columna capilar y un sistema de suministro de solvente para realizar separaciones cromatográficas en las mezclas antes del análisis mediante el espectrómetro de masas.

En algunas modalidades ilustrativas, el SCX-MS se puede realizar en condiciones nativas. Tal como se usa en la presente, la expresión "condiciones nativas" puede incluir llevar cabo una espectrometría de masas en condiciones que conserven las interacciones no covalentes en un analito. La espectrometría de masas nativa es un enfoque para estudiar la estructura biomolecular intacta en estado nativo o casi nativo. El término «nativo» hace referencia al estado biológico del analito en la solución antes de someterlo a la ionización. Se pueden controlar diversos parámetros, tales como el pH y la fuerza iónica, de la solución que contiene los analitos biológicos para mantener el estado de plegamiento nativo de los analitos biológicos en la solución. Comúnmente, la espectrometría de masas nativa se basa en la ionización por electropulverización, en donde los analitos biológicos se pulverizan de un solvente que no es desnaturizante. También se pueden usar otros términos, tales como espectrometría de masas no covalente, por pulverización nativa, ionización por electropulverización, no desnaturizante, macromolecular o supramolecular para describir la espectrometría de masas nativa. En modalidades ilustrativas, la MS nativa permite una mejor resolución espacial en comparación con MS no nativa, mejorando la detección de productos de biotransformación de una proteína terapéutica. Para obtener un análisis detallado en la MS natural, véase la reseña: Elisabetta Boeri Erba & Carlo Petosa, The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes, 24 PROTEIN SCIENCE 1176-1192 (2015).

En algunas modalidades ilustrativas, el SCX-MS se puede realizar en condiciones no nativas. Un proteína o péptido de interés se puede preparar por, por ejemplo, alquilación, reducción, desnaturización y/o digestión.

Como se usa en la presente, el término "agente alquilador de proteínas" se refiere a un agente usado para alquilar determinados residuos aminoácidos libres en una proteína. Ejemplos no limitantes de agentes alquilantes de proteínas son yodoacetamida (IOA), cloroacetamida (CAA), acrilamida (AA), N-etilmaleimida (NEM), metilmetanosulfonato (MMTS) y la 4-vinilpiridina o combinaciones de estos.

Tal como se utiliza en la presente, "desnaturalización de proteínas" puede referirse a un proceso en el que la forma tridimensional de una molécula se modifica con respecto a su estado nativo. La desnaturalización de proteínas puede llevarse a cabo utilizando un agente desnaturalizante de proteínas. Ejemplos no limitantes de un agente desnaturalizador de proteínas incluyen calor, pH alto o bajo, agentes reductores como DTT (véase más adelante) o exposición a agentes caotrópicos. Pueden usarse varios agentes caotrópicos como agentes desnaturalizantes de proteínas. Los solutos caotrópicos aumentan la entropía del sistema al interferir con las interacciones intramoleculares mediadas por fuerzas no covalentes, tales como enlaces hidrógeno, fuerzas van der Waals, y efectos hidrofóbicos. Los ejemplos no taxativos de agentes caotrópicos incluyen butanol, etanol, cloruro de guanidinio, perclorato de litio, acetato de litio, cloruro de magnesio, fenol, propanol, dodecil sulfato de sodio, tiourea, N-lauroilsarcosina, urea y sales de estos.

Tal como se usa en la presente, el término "agente reductor de proteínas" se refiere al agente que se usa para la reducción de puentes disulfuro en una proteína. Los ejemplos no taxativos de agentes reductores de proteínas que se usan para reducir una proteína son ditiotreitolo (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol, reactivo de Ellman, clorhidrato de hidroxilamina, cianoborohidruro de sodio, clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP-HCl) o combinaciones de estos.

En algunos aspectos ilustrativos, el espectrómetro de masas puede ser un espectrómetro de masas en tándem.

Tal como se usa en la presente, el término "espectrometría de masas en tándem" incluye una técnica donde se obtiene información estructural sobre las moléculas de muestra mediante el uso de múltiples etapas de selección de masas y separación de masas. Un requisito previo es que las moléculas de muestra se puedan transferir a la fase gaseosa y ionizarse inalteradas y que se pueda inducir a que se deshagan de alguna manera predecible y controlable después de la primera etapa de selección en masa. La MS/MS multietapa, o  $MS^n$  se puede llevar a cabo primero seleccionando y aislando un ion precursor ( $MS^2$ ), fragmentándolo, aislando un ion del fragmento primario ( $MS^3$ ), fragmentándolo, aislando un fragmento secundario ( $MS^4$ ), y así sucesivamente siempre que se pueda obtener información significativa o la señal del ion del fragmento sea detectable. La MS en tándem se ha realizado con éxito con una amplia variedad de combinaciones de analizadores. Qué analizadores combinar para una determinada aplicación está determinado por muchos factores diferentes, tales como la sensibilidad, la selectividad y la velocidad, pero también el tamaño, el costo y la disponibilidad. Las dos categorías principales de métodos de MS en tándem son en tándem en el espacio y en tándem en el tiempo, pero también hay híbridos en los que los analizadores en tándem en el tiempo se acoplan en el espacio o con analizadores en tándem en el espacio. Un espectrómetro de masas en tándem en el espacio comprende una fuente de iones, un dispositivo de activación de iones precursores y al menos dos analizadores de masas que no atrapan. Pueden

diseñarse funciones de separación de  $m/z$  específicas de modo que en una sección del instrumento se seleccionen iones, se disocien en una región intermedia y los iones producto se transmitan luego a otro analizador para separación  $m/z$  y adquisición de datos. En el espectrómetro de masas en tándem en el tiempo, los iones producidos en la fuente de iones pueden atraparse, aislarse, fragmentarse y separarse por  $m/z$  en el mismo dispositivo físico. Los péptidos identificados por el espectrómetro de masas pueden usarse como representantes sustitutos de la proteína intacta y sus modificaciones postraduccionales. Se pueden utilizar para la caracterización de proteínas al correlacionar datos de MS/MS experimentales y teóricos, estos último generados a partir de posibles péptidos en una base de datos de secuencias de proteínas. La caracterización incluye, de modo no taxativo, secuenciar aminoácidos de los fragmentos de proteínas, determinar la secuenciación de proteínas, determinar la secuenciación de novo de proteínas, localizar modificaciones postraduccionales o identificar modificaciones postraduccionales, análisis de comparabilidad o combinaciones de estos.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "base de datos" se refiere a una colección compilada de secuencias de proteínas que posiblemente puedan existir en una muestra, por ejemplo en forma de archivo en formato FASTA. Las secuencias de proteínas relevantes pueden derivarse de secuencias de ADNc de una especie en estudio. Las bases de datos públicas que pueden utilizarse para buscar secuencias de proteínas relevantes incluyen bases de datos alojadas, por ejemplo, en Uniprot o Swiss-prot. Las bases de datos pueden buscarse utilizando lo que aquí se denomina "herramientas bioinformáticas". Las herramientas bioinformáticas permiten buscar espectros MS/MS no interpretados en todas las secuencias posibles de la base o bases de datos, y proporcionan como resultado espectros MS/MS interpretados (anotados). Ejemplos no taxativos de tales herramientas son Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), Spectrum Mill ([www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com)), PLGS ([www.waters.com](http://www.waters.com)), PEAKS ([www.bioinformaticssolutions.com](http://www.bioinformaticssolutions.com)), Proteinpilot ([download.appliedbiosystems.com/proteinpilot](http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot)), Phenyx ([www.phenyx-ms.com](http://www.phenyx-ms.com)), Sorcerer ([www.sagenresearch.com](http://www.sagenresearch.com)), OMSSA ([www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/)), X!Tandem ([www.thegpm.org/TANDEM/](http://www.thegpm.org/TANDEM/)), Protein Prospector ([prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm](http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm)), Byonic ([www.proteinmetrics.com/products/byonic](http://www.proteinmetrics.com/products/byonic)) o Sequest ([fields.scripps.edu/sequest](http://fields.scripps.edu/sequest)).

En algunas modalidades ilustrativas, el espectrómetro de masas se une al sistema de cromatografía, por ejemplo, SCX.

En algunas modalidades ilustrativas, el espectrómetro de masas puede acoplarse a un sistema de cromatografía líquida y monitorización de reacciones múltiples. En términos más generales, un espectrómetro de masas puede ser capaz de realizar análisis mediante la monitorización de

reacciones seleccionadas (SRM), incluyendo la monitorización de reacciones consecutivas (CRM) y la monitorización de reacciones paralelas (PRM).

Tal como se utiliza en la presente, la "monitorización de reacciones múltiples" o "MRM" se refiere a una técnica basada en la espectrometría de masas que puede cuantificar con

5 precisión moléculas pequeñas, péptidos y proteínas dentro de matrices complejas con alta sensibilidad, especificidad y un amplio rango dinámico (Paola Picotti & Ruedi Aebersold, Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions, 9 NATURE METHODS 555-566 (2012)). La MRM puede realizarse típicamente con espectrómetros de masas de triple cuadrupolo en donde un ion precursor correspondiente a las  
10 pequeñas moléculas/péptidos seleccionados se selecciona en el primer cuadrupolo y un ion fragmento del ion precursor se seleccionó para monitorización en el tercer cuadrupolo (Yong Seok Choi et al., Targeted human cerebrospinal fluid proteomics for the validation of multiple Alzheimers disease biomarker candidates, 930 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 129-135 (2013)).

15 En algunos aspectos, el espectrómetro de masas en el método o sistema de la presente solicitud puede ser un espectrómetro de masas de ionización por electrospray, un espectrómetro de masas de ionización por nano-electrospray o un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, en donde el espectrómetro de masas puede acoplarse a un sistema de cromatografía líquida, en donde el espectrómetro de masas es capaz de realizar análisis LC-  
20 MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas) o LC-MRM-MS (cromatografía líquida-monitorización de reacción múltiple-espectrometría de masas).

Como se usa en la presente, el término "anализador de masas" incluye un dispositivo que puede separar especies, es decir, átomos, moléculas o grupos, según su masa. Ejemplos no taxativos de analizadores de masas que podrían emplearse son el tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas  
25 en inglés), el sector eléctrico/magnético, el filtro de masas cuadrupolar (Q), la trampa de iones cuadrupolar (QIT, por sus siglas en inglés), orbitrap, la resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier (FTICR, por sus siglas en inglés), y también la técnica de espectrometría de masas con acelerador (AMS, por sus siglas en inglés).

Se entiende que la presente invención no se limita a ninguna de las mencionadas proteínas de  
30 interés, anticuerpo(s), fragmento(s) de anticuerpo, muestra(s), impureza(s), PTM, método(s) de inmunoprecipitación, método(s) o sistema(s) de cromatografía líquida, espectrómetro(s) de masas, agente(s) alquilante(s), agente(s) reductor(es), enzima(s) digestiva(s), base(s) de datos o herramienta(s) bioinformática(s), y cualquier proteína de interés, anticuerpo(s), fragmento(s) de anticuerpo, muestra(s), impureza(s), PTM, método(s) de inmunoprecipitación, método(s) o  
35 sistema(s) de cromatografía líquida, espectrómetro(s) de masas, agente(s) alquilante(s), agente(s) reductor(es), enzima(s) digestiva(s), base(s) de datos, o herramienta(s) bioinformática(s) puede(n) seleccionarse por cualquier medio adecuado.

La presente invención se entenderá de forma más detallada por referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, no debe entenderse que limiten el alcance de la invención.

## EJEMPLOS

Un modalidad ilustrativa del método de la presente invención se ilustra en la Figura 1. El primer componente mostrado es un cartucho que contiene microesferas de agarosa conjugadas con elementos de estreptavidina. El anticuerpo anti-Fc humano biotinilado se añade al cartucho y se une a las microesferas de estreptavidina para producir microesferas de inmunoprecipitación. El anticuerpo anti-Fc humano biotinilado puede producirse o adquirirse comercialmente. Una reacción ilustrativa biotina-estreptavidina comprende la incubación a temperatura ambiente durante unos 15 minutos. Las muestras que incluyen el analito se añaden entonces al cartucho y se incuban para inmunoprecipitar o "extraer" el analito. Un proceso ilustrativo de inmunoprecipitación comprende la incubación a temperatura ambiente durante una 1 hora. El ejemplo ilustrado es una muestra de un estudio farmacocinético que comprende un anticuerpo trispecífico como la proteína de interés y el analito, pero el método de la presente invención no se limita a este ejemplo y se puede aplicar a cualquier muestra adecuada que comprende cualquier anticuerpo o proteína relacionada con anticuerpos.

A continuación, se lava la muestra para eliminar los componentes unidos de forma no específica. Una etapa de lavado ilustrativa consiste en lavar el cartucho con 6 volúmenes de amortiguador HBS-EP (Cytiva), seguido de 6 volúmenes de Tris-HCl (10 mM, pH 7,5). A continuación, se añade una enzima digestiva, por ejemplo IdeS o una variante de esta, al cartucho y se incuba, lo que conduce a la escisión del analito unido, por ejemplo separando el fragmento Fc del fragmento Fab<sub>2</sub> de un anticuerpo. Una etapa de digestión ilustrativa comprende la adición de 40 unidades de la proteína IdeS FabRICATOR® (Genovis), o 1 unidad de enzima digestiva por µg de analito, y la incubación a unos 37 °C durante unos 30 minutos a 1 hora. El cartucho se centrifuga ("centrifuga") para eluir los fragmentos Fab<sub>2</sub> liberados, y el eluido se recoge para el posterior análisis SCX-MS nativo.

Los métodos ilustrativos para el análisis SCX-MS nativo se describen en Yan et al., 2020, J Am Soc Mass Spectrom, 31:2171-2179, que se incorpora al presente documento mediante referencia. En una modalidad ilustrativa, las condiciones de SCX-MS son las siguientes. La columna SCX es YMC BioPro IEX SF 4,6 x 50 mm, 5 µm. La temperatura de la columna es de 45 °C. La fase móvil A (MPA) comprende 10 mM de acetato de amonio, y la fase móvil B (MPB) comprende 300 mM de acetato de amonio. El caudal es de 0,4 ml/minuto. El gradiente es: 0-1 minutos: 100 % MPA; 1-9 minutos: 100 % MPA a 100 % MPB; 9-10,5 minutos: 100 % MPB; 10,5-10,6 minutos: 100 % MPB a 100 % MPA; y 10,6-15 minutos: 100 % MPA.

La resolución MS se fija a 12 500 (UHMR). La tensión de pulverización capilar se fija en 3,0 kV. La temperatura capilar se fija en 350 °C. El nivel de RF de la lente S se fija en 200. La energía

de fragmentación en la fuente se fija en 100. La presión de gas atrapado se fija en 3. Los espectros de masas se adquieren con un margen de intervalo  $m/z$  entre 2000 y 15 000.

### **Ejemplo 1. Selección de columna SCX**

Se comparó el rendimiento de múltiples columnas SCX para optimizar el método de la presente invención. Los fragmentos Fab<sub>2</sub> se prepararon como se ha descrito anteriormente y se sometieron a un análisis SCX-MS nativo. Se comparó Bioresolve SCX 2,1 x 50 mm con YMC SCX 4,6 x 50 mm. Los cromatogramas de iones totales (TIC) de SCX-MS para cada columna se muestran en la Figura 2, con los correspondientes caudales y temperaturas para cada experimento. Basándose en la sensibilidad demostrada del método, se utilizó YMC SCX 4,6 x 50 mm para experimentos posteriores, utilizando un gradiente de 8 minutos de 10 a 300 mM de amortiguador de acetato de amonio.

### **Ejemplo 2. Establecer el límite de detección y el límite de cuantificación en solución pura.**

El método SCX-MS nativo de la presente invención se probó con fragmentos Fab<sub>2</sub> en solución pura para establecer un límite de detección (LOD). La solución pura comprendía un analito de anticuerpo y un anticuerpo estándar interno (300 pg/μl, o 600 pg en la columna) en amortiguador Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Se probó una gama de anticuerpos como analito, con pl que iban de alto a bajo, como se muestra en la Figura 3A. Los rangos de pl de los anticuerpos ensayados estaban entre 6,28 y 8,15. Las cantidades de muestra probadas oscilaron entre 20 pg y 2 μg en la columna, con rangos de concentración entre 10 pg/μl y 1 μg/μl.

Se realizó una serie SCX de 15 minutos para cada muestra, cada una con un caudal de 0,2 ml/minuto, excepto para Ab9. Los anticuerpos ensayados incluían anticuerpos IgG1 e IgG4, y mAbs y bsAbs, representando una diversa variedad de anticuerpos terapéuticos. El método de la presente invención fue capaz de separar y analizar eficazmente cada anticuerpo con alta sensibilidad. Los espectros de masas de dos anticuerpos ilustrativos en un rango de concentraciones entre 20 pg y 20 ng se muestran en las Figuras 3B y 3C. Se determinó que el LOD absoluto de los fragmentos de Fab<sub>2</sub> usando el método de la presente invención en estas condiciones era 20 pg.

El LOD y el límite de cuantificación (LOQ) en solución pura se evaluaron adicionalmente como se muestra en la Figura 4. El fragmento Fab<sub>2</sub> de mAb1 se analizó utilizando SCX-MS nativo, con el fragmento Fab<sub>2</sub> de mAb2 utilizado como patrón interno, como se muestra en un TIC en la Figura 4A. La Figura 4B muestra una comparación de la concentración real de mAb1 comparada con la intensidad normalizada con el estándar interno, medida por el método de la presente invención, en un rango de concentraciones entre 20 pg y 20 ng. Las concentraciones reales frente a las medidas muestran una relación lineal con un R<sup>2</sup> ponderado de 0,9954, lo que demuestra la capacidad del método de la presente invención para cuantificar con precisión y sensibilidad un analito a bajas concentraciones. La Figura 4C muestra la misma comparación

realizada con un rango de concentraciones entre 20 ng y 2 µg, con una fuerte relación lineal demostrada de nuevo en este rango de concentración más alto. Se muestran espectros de masas ilustrativos entre 20 pg y 20 µg en la Figura 4D, que ilustra además la sensibilidad y especificidad del método de la presente invención.

### 5 **Ejemplo 3. Establecer el límite de detección y el límite de cuantificación en suero.**

La solidez del método de la presente invención se demostró además usando analitos de una muestra de suero de ratón. El análisis de una proteína de interés en suero presenta numerosos desafíos adicionales, incluyendo heterogeneidad de la proteína de interés debido a la biotransformación, e interferencia debido a una matriz compleja, tal como concentración alta de  
10 proteínas de suero.

Los fragmentos Fab<sub>2</sub> de mAb1 se prepararon como se ha descrito previamente y se sometieron a un análisis SCX-MS nativo. En la Figura 5A se muestra la linealidad de la relación de respuesta (la intensidad medida del analito normalizada a un estándar interno) a la concentración real del anticuerpo. Las Figuras 5B y 5C muestran otros insertos, demostrando la  
15 linealidad de la respuesta incluso a bajas concentraciones. Estos resultados demuestran la sensibilidad y eficacia del método de la presente invención en la cuantificación de anticuerpos incluso a bajas concentraciones en suero.

La estabilidad del método de la presente invención se demostró además trazando la linealidad de la intensidad medida, sin normalización a un estándar interno, en comparación con la  
20 concentración de anticuerpo, como se muestra en la Figura 6A. Las Figuras 6B y 6C muestran otros insertos que demuestran la linealidad de la intensidad medida a bajas concentraciones en suero, incluso sin normalización a un estándar interno.

En la Figura 7 se muestran espectros de masas que ilustran el LOD y LOQ de mAb1 Fab<sub>2</sub> en suero y en solución pura. Se determinó que el LOD era tan bajo como 0,025 µg/ml en suero, lo  
25 que equivale a 50 pg en la columna SCX, como se muestra en la Figura 7A. Se determinó que el LOQ era tan bajo como 0,05 µg/ml en suero, lo que equivale a 100 pg en la columna SCX, como se muestra en la Figura 7B. Se indicó una relación señal-ruido (S/N) de 5 como un estándar razonable para establecer el LOQ. Las intensidades absolutas de mAb1 Fab<sub>2</sub> detectadas a partir de muestras de suero fueron superiores a las detectadas en la solución  
30 pura, lo que sugiere que el límite de sensibilidad de las muestras de suero se debe al ruido de la proteína de suero co-IP.

Además de los ejemplos divulgados en el presente documento, es posible obtener LOD y LOQ aún más bajos usando el método de la presente invención en condiciones más favorables que serían conocidas por una persona experta en la materia, por ejemplo usando un anticuerpo con  
35 un tiempo de elución más tardío, o usando un mayor volumen de lavado durante la IP.