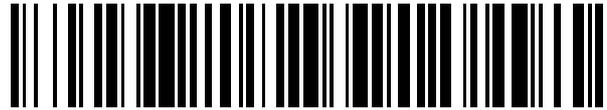


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 971**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2009 E 09747326 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2277044**

54 Título: **Análisis de conjugados de fármacos y anticuerpos mediante espectrometría de masas con captura por afinidad basada en esferas**

30 Prioridad:

13.05.2008 US 52727

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

07.09.2015

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**KAUR, SURINDER;
SAAD, OLA y
XU, KEYANG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 544 971 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análisis de conjugados de fármacos y anticuerpos mediante espectrometría de masas con captura por afinidad basada en esferas

5

Referencia a solicitudes relacionadas

Esta solicitud no provisional presentada conforme a 37 CFR § 1.53(b), reivindica el beneficio conforme a 35 USC §119(e) sobre la solicitud provisional de EE-UU- nº de serie 61/052.727 presentada el 13 de mayo de 2008, que se incorpora por referencia en su totalidad.

10

Campo de la invención

La invención se refiere en general a métodos para capturar, detectar, analizar, seleccionar, caracterizar y cuantificar compuestos conjugados de anticuerpos, incluyendo conjugados de anticuerpo-fármaco, y sus fragmentos y metabolitos, mediante espectrometría de masas. La invención también se refiere a métodos para preparar muestras para espectrometría de masas para estudios farmacocinéticos y toxicocinéticos.

15

Antecedentes de la invención

20

Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) son terapéuticas anticancerosas dirigidas diseñadas para reducir las toxicidades inespecíficas e incrementar la eficacia respecto a la molécula pequeña convencional y a la quimioterapia con anticuerpos para el cáncer. Emplean la potente capacidad para dirigir anticuerpos monoclonales para liberar específicamente terapéuticas de molécula pequeña conjugadas y altamente potentes frente a una célula cancerosa. Para evaluar las propiedades tales como la farmacocinética y la toxicidad de estos conjugados anticuerpo-fármaco, es útil ser capaz de caracterizar y cuantificarlos a partir de plasma, orina y otras muestras biológicas. Además, la capacidad para cuantificar el fármaco libre (no conjugado con el anticuerpo) en el método de la misma muestra y la misma inyección cromatográfica también sería útil.

25

30

Se han usado diversas técnicas de espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de terapéuticas de moléculas pequeñas en los estudios farmacocinéticos, tales como: impacto de electrones (IE), ionización química (IQ), ionización química por desorción (IQD), bombardeo rápido con átomos (BRA), ionización por electropulverización (ESI), ionización/desorción por láser asistida por matriz (MALDI) y espectrometría de masas en tándem (EM / EM) (Yao et al (2001) Jour. de Chrom. B 752:9 - 16; Royer et al (1995) Rapid Comm. in Mass Spec. 9:495 - 502), incluyendo el modo de monitorización on ion único (SIM) de selección de iones para desconvolución (Souppart et al (2002) Jour. of Chrom. B 774:195 - 203; Wong et al (2001) Jour. of Chrom. 765:55 - 62; Yao et al (1998) Jour. of Chrom. B 718:77 - 85; Abdel-Hamid et al (2001) Jour. of Chrom. B 753:401 - 408; Marques et al (2001) Jour. of Chrom. 762:87 - 95). Estos métodos e instrumentación requieren la separación de los diversos analitos a partir de fluidos biológicos para la sensibilidad suficiente. Tal purificación puede ser muy laboriosa, lenta, y requerir grandes volúmenes de fluidos de muestra debido a la baja concentración de los analitos de interés en muestras, tales como medio de cultivo celular, plasma humano, orina y bilis.

35

40

La combinación directa de una etapa frontal de separación / aislamiento / purificación acoplada a detección / caracterización / cuantificación mediante espectrometría de masas es eficaz para los estudios metabólicos de muestras biológicas complejas. Normalmente, la CL / EM se utiliza para la caracterización de los anticuerpos (Martin et al (1997) Cancer Chemother. Pharmacol. 40:189 - 201; documentos WO 03/046571; WO 03/046572), y se utiliza ELISA para la cuantificación en matrices biológicas (Murray et al (2001) J. Imm. Methods 255:41 - 56; Kirchner et al (2004) Clin. Pharmacokinetics 43(2):83 - 95). Normalmente los ensayos de ELISA son sensibles y susceptibles a tamizados de alto rendimiento.

45

50

Los recientes avances en el análisis de proteínas mediante espectrometría de masas (EM) se deben a las técnicas frontales de introducción e ionización en fase de gas tal como ionización por electropulverización (ESI), ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI, documento US 2003/0027216) e ionización de desorción láser con potenciación de superficie (SELDI, documento US 6020208), así como mejoras en la sensibilidad del instrumento, resolución, exactitud de la masa, bioinformática y algoritmos de desconvolución de datos en software ("Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications", Cole, R.B., Ed. (1997) Wiley, New York; "Modern Protein Chemistry: Practical Aspects", Howard, G.C. y Brown, W.E., Eds. (2002) CRC Press, Boca Raton, FL, p. 71 - 102;). La estructura primaria (secuencia), secundaria y terciaria de las proteínas se puede sondar y deducir con EM. La ionización por electropulverización (ESI) proporciona la ionización a presión atmosférica (IPA) de una muestra de líquido. El proceso de electropulverización crea gotitas altamente cargadas que, en virtud de la evaporación, crean iones representativos de las especies contenidas en la solución. Un orificio de muestreo de iones de un espectrómetro de masas puede utilizarse para obtener muestras de estos iones en fase gaseosa para el análisis de masas. La respuesta para un analito medida mediante el detector de espectrómetro de masas depende de la concentración del analito en el fluido y es independiente del caudal del fluido.

55

60

65

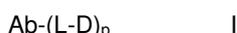
Se han divulgado métodos para detectar y seleccionar conjugados anticuerpo-fármaco mediante captura en membrana de inmutofinidat captura (MIA) y espectrometría de masas (documento US 2005/0232929).

Sumario

5 La invención incluye métodos para detectar, seleccionar y cuantificar compuestos conjugados de anticuerpos y composiciones de los mismos, mediante captura de inmutofinidat con esferas, separación, cromatografía y espectrometría de masas como se define en las reivindicaciones.

10 La captura de inmutofinidat con esferas se realiza con esferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina que se centra en: (i) la fuerte interacción estreptavidina-biotina, (ii) alta capacidad de unión para capturar material suficiente para el análisis de proteínas intactas, (iii) baja unión no específica, (iv) elución de los constituyentes de la muestra con disolventes compatibles con espectrometría de masas, (v) buena recuperación de la muestra y (vi) posibilidad de automatización.

15 La invención se refiere a compuestos conjugados de anticuerpos que tienen la Fórmula I:

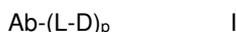


20 en la que

- Ab es un anticuerpo;
- D es un resto de fármaco maitansinoide o monometilauristatina;
- L es un enlazador unido covalentemente al Ab y unido covalentemente a D; y
- 25 p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

Un aspecto de la invención incluye un método para detectar compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden:

30 (i) procesar una muestra biológica recogida de una fuente biológica seleccionada de un mamífero, tejido, cultivo celular, plasma o suero previamente puestos en contacto con un compuesto de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I:



35 en la que

- Ab es un anticuerpo;
- Des un resto de fármaco maitansinoide o monometilauristatina;
- 40 L es un enlazador unido covalentemente al Ab y unido covalentemente a D; y
- p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8, para formar una muestra de análisis mediante la formulación, inmovilización, centrifugación, aislamiento, digestión, inducción o prevención de la coagulación de las células sanguíneas, hidrólisis o purificación para formar una muestra de análisis procesada;

45 (ii) capturar la muestra de análisis procesada sobre esferas de inmutofinidat que comprenden un antígeno específico para la muestra de análisis procesada, en la que la esfera de inmutofinidat es una esfera magnética recubierta con estreptavidina;

(iii) eluir la muestra de análisis procesada;

50 (iv) aplicar la muestra de análisis eluida a un medio de separación para efectuar la separación de más de una muestra constituyente por cromatografía líquida de flujo capilar en la que un constituyente de la muestra separada comprende un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I, en la que p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8; y

55 (v) establecer la relación entre la masa y la carga de uno o más constituyentes de la muestra separados que es un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I, en la que p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI).

La invención puede entenderse por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones de ejemplo, tomadas junto con los dibujos, figuras y ejemplos adjuntos. La discusión a continuación es descriptiva, ilustrativa y de ejemplo, y no debe tomarse como una limitación del alcance definido por las reivindicaciones adjuntas

60 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1a muestra una ilustración de anticuerpos (MAB) y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que se unen al DEC (dominio extracelular) de una proteína ECD biotinilada que está unida a una esfera paramagnética recubierta con estreptavidina en contacto con un imán.

65 La Figura 1b muestra una ilustración de anticuerpos (MAB) y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que se

unen al DEC (dominio extracelular) de una proteína ECD que está unida covalentemente a una esfera.

La Figura 2 muestra una ilustración de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que se unen a un anticuerpo monoclonal anti-fármaco biotinilado (MAb anti-fármaco-biotina) que está unido a una esfera paramagnética recubierta con estreptavidina en contacto con un imán.

La Figura 3 muestra las ilustraciones de conjugados de anticuerpo-fármaco modificados con cisteína, desde la parte superior a la parte inferior: dos restos farmacológicos MMAE situados en la cadena ligera - Tio Hu Anti HER2 4D5 LC V205C-MC-vc-PAB-MMAE; dos restos farmacológicos MMAE situados en la cadena pesada - Tio Hu Anti HER2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE; dos restos farmacológicos MMAE ubicados en la región Fc de la cadena pesada - Tio Hu Anti HER2 4D5 Fc S400C-MC-vc-PAB-MMAE; y un anticuerpo modificado con cisteína listo para la conjugación: Tio Hu Anti HER2 4D5 Fc S400C.

La figura 4 muestra los cambios en la proporción fármaco/anticuerpo (DAR) para: (arriba) cadena ligera (Tio Hu Anti HER2 4D5 LC V205C-MC-vc-PAB-MMAE) y (abajo) cadena pesada (Tio Hu Anti HER2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE) variantes del DEC en el plasma después de la captura por afinidad del CED modificado con esferas y caracterización por espectrometría de masas a partir de muestras de estabilidad en plasma *in vitro* recogidas a los puntos de tiempo 0, 8, 24, 48, y 96 horas. A los constituyentes de la muestra se les asignó una DAR de 0 (anticuerpo desnudo), 1 (un unidad enlazadora del fármaco MC-vc-PAB-MMAE) y 2 (dos unidades enlazadoras del fármaco MC-vc-PAB-MMAE).

La Figura 5 muestra los datos de espectrometría de masas con desconvolución de estabilidad de muestras de Tio Hu Anti HER2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE (100 µg/ml en plasma de rata incubado a 37 °C) recogidas en los puntos de tiempo 0, 8, 24, 48, y 96 horas, como se representa gráficamente en la Figura 4 (parte inferior). A los constituyentes de la muestra se les asignó una DAR de +0 (anticuerpo desnudo), +1D (un unidad enlazadora del fármaco MC-vc-PAB-MMAE) y +2D (dos unidades enlazadoras del fármaco MC-vc-PAB-MMAE). Los pequeños picos a aproximadamente 151.000 uma son constituyentes de la muestra que han sufrido una desglicosilación incompleta.

La Figura 6 muestra los datos de espectrometría de masas con desconvolución de estabilidad de muestras de Tio Hu Anti MUC16 (3A5) HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE (100 µg/ml en plasma de rata incubado a 37 °C) recogidas en los puntos de tiempo 0, 6, 24, 48, y 96 horas. A los constituyentes de la muestra se les asignó una DAR de +0 (anticuerpo desnudo), +1D (un unidad enlazadora del fármaco MC-vc-PAB-MMAE) y +2D (dos unidades enlazadoras del fármaco MC-vc-PAB-MMAE).

La Figura 7 muestra los cambios de distribución del fármaco / anticuerpo (DAR) con el tiempo en el estudio de estabilidad en plasma de rata de Hu Anti MUC16 (3A5) HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE.

La Figura 8 muestra datos de espectrometría de masas con desconvolución de estabilidad Tio Hu Anti MUC16 (3A5) HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE (100 µg/ml incubados a 37 °C) en muestras de rata, mono cynomolgus, y plasma humano, y tampón (histidina/acetato 20 mM, trehalosa 240 mM, 0,02 % de polisorbato 20, pH 5,5 con 0,5 % de BSA) recogidas en el punto de tiempo de 96 horas y capturada mediante el rhuMUC16 DEC.

La Figura 9 muestra datos de espectrometría de masas con desconvolución de la cinética *in vivo* en monos cynomolgus a los que se ha administrado 38 mg / kg de Tio Hu Anti MUC16 (3A5) HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE. La carga promedio del fármaco fue de 1,6 de MMAE/3A5. Aproximadamente el 30 % del DEC administrado fue DAR 1. Las muestras de plasma se recogieron a los puntos de tiempo de 5 minutos, 6 horas, 24 horas, 72 horas, 6 días, 8 días, 15 días y 22 días y se capturaron mediante el método de esferas modificadas con DEC por inmunofinidad. A los constituyentes de la muestra se les asignó una DAR de +0 (anticuerpo desnudo), +1D (un unidad enlazadora del fármaco MC-vc-PAB-MMAE) y +2D (dos unidades enlazadoras del fármaco MC-vc-PAB-MMAE). Los pequeños picos a aproximadamente 149.000 y 150.000 uma son constituyentes de la muestra que han sufrido una desglicosilación incompleta.

La figura 10a muestra un formato de ensayo ELISA total mediante el cual el DEC de un receptor se inmoviliza sobre un soporte sólido para la unión a anticuerpo o al conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). El ADC se une a un F(ab')₂ de cabra anti-Fc humano-HRP (peroxidasa de rábano) para la detección quimioluminiscente.

La Figura 10b muestra un formato de ensayo ELISA conjugado mediante el cual un MAb anti-fármaco se inmoviliza sobre un soporte sólido para la unión a un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). El ADC se une a un DEC biotinilado de un receptor en solución. Después, el complejo puede unirse a la peroxidasa de rábano-estreptavidina (HRP) para la detección quimioluminiscente.

La Figura 11 muestra una comparación de la detección de constituyentes de la muestra por el método ELISA y por el método de espectrometría de masas (EM)/captura de ECD por inmunofinidad con esferas modificadas mediante un gráfico del porcentaje de anticuerpo restante conjugado con el resto de fármaco en muestras de plasma de rata con puntos de tiempo de hasta 96 horas.

Descripción detallada de las realizaciones de ejemplo

A continuación se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y las fórmulas adjuntas. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que no se pretende que limiten la invención a esas realizaciones. Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. La presente invención no está de ninguna manera limitada a los métodos y materiales descritos.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente y son consistentes con: Singleton et al, (1994) "Dictionary of Microbiology and Molecular Biology", 2ª Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY; and Janeway, et al (2001) "Immunobiology", 5ª Ed., Garland Publishing, New York. Cuando en el presente documento se usan nombres comerciales, los solicitantes pretenden incluir de forma independiente la formulación comercial del producto, el nombre genérico y el(los) ingrediente(s) farmacéutico(s) activo(s) del producto comercial.

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, con los siguientes términos y frases como se usan en la presente memoria descriptiva se pretende que tengan los significados siguientes:

"Anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. (Janeway, et al (2001) "Immunobiology", 5th Ed., Garland Publishing, New York). En general, un antígeno diana tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítopos, reconocidos por CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítipo diferente tiene una estructura diferente. Por tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo también se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo dichas dianas, entre otras, células cancerosas o células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina divulgada en el presente documento puede ser de cualquier tipo (IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden proceder de cualquier especie. No obstante, en un aspecto, la inmunoglobulina es de origen humano, murino, o de conejo.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente el fragmento de unión a antígeno o una región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad), DEC (dominio extracelular) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen inmuno-específicamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo de una cadena y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

En el presente documento, un "anticuerpo intacto" es uno que comprende los dominios VL y VH de la región variable de unión a antígeno, así como los dominios constantes completos de las cadenas pesada y ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (p. ej., dominios constantes de la secuencia nativa humana) o una variante de la secuencia de aminoácidos de los mismos. El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras", que hacen referencia a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o una región Fc de la variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de las funciones efectoras del anticuerpo incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA); fagocitosis; y regulación por disminución de los receptores de superficie (por ejemplo, el receptor de células B y BCR) etc.

"Anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en cuanto a que pueden sintetizarse no contaminados con otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler, et al., (1975) Nature 256:495, o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase el documento US 4816567). Los anticuerpos monoclonales pueden también aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al (1991) Nature, 352:624 - 628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581 - 597.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" En los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos concretos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (documento US 4816567; y Morrison, et al. (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:68516855). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., mono del viejo mundo o simio) y secuencias de la región constante humana.

"Muestra biológica" significa (i) sangre, bilis, orina o heces; (ii) extracto de tejido; y (iii) medios de cultivo celular, lisado celular o extracto celular.

"Fuente biológica" significa (i) mamíferos tales como un ratón, una rata, un conejo, un perro, un mono, o un ser humano; (ii) tejido de mamífero; y (iii) células cultivadas.

"Marcador" significa cualquier resto que se puede unir covalentemente a un anticuerpo y que funciona para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primero o segundo marcador, por ejemplo, FRET (transferencia de energía por fluorescencia de resonancia); (iii) estabilizar las interacciones o aumentar la afinidad de la unión, con el antígeno o ligando; (iv) afectar a la movilidad, por ejemplo, movilidad electroforética, o permeabilidad celular, por carga, hidrofobicidad, forma, u otros parámetros físicos, o (v) proporcionar un resto de captura, para modular la afinidad del ligando, la unión anticuerpo / antígeno, o la formación de complejos iónicos.

ANTICUERPOS

La unidad del anticuerpo (Ab-) de Fórmula I incluye dentro de su alcance cualquier unidad de un anticuerpo (Ab) que se une o asocia reactivamente o forma complejos con un receptor, antígeno u otro resto receptor asociado con una población de células diana dada. Un anticuerpo puede ser cualquier proteína o molécula similar a proteína que se une, forma complejos con o reacciona con un resto de una población celular que se busca para modificar terapéutica o, por el contrario, biológicamente. En un aspecto, la unidad de anticuerpo actúa para liberar la unidad de fármaco a la población de células diana particular con la que la unidad de anticuerpo reacciona. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de peso molecular grande, tales como, los anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos que comprenden Ab en los conjugados de anticuerpo-fármaco de fórmula I (ADC) y que pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos contra antígenos asociados a tumores (AAT). En la técnica se conocen dichos antígenos asociados con tumores (AAT) y se pueden preparar para usar en la generación de anticuerpos usando procedimientos e información muy conocidos en la técnica. En intentos de descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y terapia del cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana o, de otro modo, asociados con tumores que se expresan específicamente sobre la superficie de uno o más tipos concretos de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados con tumores se expresan de forma más abundante sobre la superficie de las células cancerosas en comparación con sobre la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antigénicos de superficie celular asociados con tumores ha dado lugar a la capacidad de dirigirse específicamente a células cancerosas para la destrucción mediante terapias basadas en anticuerpos.

Ejemplos de AAT incluyen, entre otros, AAT (1)-(35) que se indican a continuación. Por conveniencia, la información relativa a estos antígenos, todos los cuales son conocidos en la técnica, se enumera a continuación e incluye nombres, nombres alternativos, números de acceso en GenBank y de referencia primaria. Los antígenos asociados a tumores a los que están dirigidos los anticuerpos incluyen variantes de secuencias de aminoácidos e isoformas que poseen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % respecto a las secuencias identificadas en las referencias citadas o que exhiben sustancialmente las mismas propiedades biológicas o características como un AAT que tiene una secuencia encontrada en las referencias citadas. Por ejemplo, un AAT que tiene una secuencia variante generalmente puede unirse a específicamente un anticuerpo que se une específicamente al AAT con la correspondiente secuencia indicada.

ANTÍGENOS ASOCIADOS CON TUMORES (1)-(36):

(1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, nº de acceso en Genbank NM_001203) ten Dijke, P., et al. *Science* 264 (5155):101104 (1994), *Oncogene* 14 (11):13771382 (1997)); documento WO2004/063362 (Reivindicación 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/134790-A1 (Páginas 38-39); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 296); documento WO2003/055443 (Página 91-92); documento WO2002/99122 (Ejemplo 2; Página 528-530); documento

WO2003/029421 (Reivindicación 6); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig. 112); documento WO2002/98358 (Reivindicación 1; Página 183); documento WO2002/54940 (Página 100-101); documento WO2002/59377 (Página 349-350); documento WO2002/30268 (Reivindicación 27; Página 376); documento WO2001/48204 (Ejemplo; Fig. 4). NP_001194 receptor de la proteína morfogenética ósea, de tipo IB

5 /pid=NP_001194.1 –Referencias cruzadas: MIM:603248; NP_001194.1; NM_001203_1
 (2) E16 (LAT1, SLC7A5, nº de acceso en Genbank NM_003486) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 (2), 283288 (1999), *Nature* 395 (6699):288291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (16):11267-11273; documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento

10 WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento WO2002/99074 (Reivindicación 19; Página 127129); documento WO2002/86443 (Reivindicación 27; Páginas 222, 393); documento WO2003/003906 (Reivindicación 10; Página 293); documento WO2002/64798 (Reivindicación 33; Página 9395); documento WO2000/14228 (Reivindicación 5; Páginas 133-136); documento US2003/224454 (Fig. 3); documento WO2003/025138 (Reivindicación 12; Página 150); NP_003477 familia del transportador de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 5 /pid=NP_003477.3 - Homo sapiens; Referencias cruzadas: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1

15 (3) STEAP1 (seis antígenos epiteliales transmembrana del la próstata, nº de acceso en Genbank NM_012449); *Cancer Res.* 61 (15), 58575860 (2001), Hubert, R.S., et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25):1452314528; documento WO2004/065577 (Reivindicación 6); documento WO2004/027049 (Fig. 1L); EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2004/016225 (Reivindicación 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/157089 (Ejemplo 5); documento US2003/185830 (Ejemplo 5); documento US2003/064397 (Fig. 2); documento WO2002/89747 (Ejemplo 5; Página 618619); documento WO2003/022995 (Ejemplo 9; Fig. 13A, Ejemplo 53; Página 173, Ejemplo 2; Fig. 2A); NP_036581 seis antígenos epiteliales transmembrana de la próstata; Referencias cruzadas: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1

20 (4) 0772P (CA125, MUC16, nº de acceso en Genbank AF361486); *J. Biol. Chem.* 276 (29):27371-27375 (2001); documento WO2004/045553 (Reivindicación 14); documento WO2002/92836 (Reivindicación 6; Fig. 12); documento WO2002/83866 (Reivindicación 15; Página 116-121); documento US2003/124140 (Ejemplo 16); documento WO200206317 (Reivindicación 6; Página 400 - 408); Referencias cruzadas: GI:34501467; AAK74120.3; AF3614R6_1

25 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina, nº de acceso en Genbank NM_005823) Yamaguchi, N., et al. *Biol. Chem.* 269 (2), 805808 (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (20):1153111536 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1):136140 (1996), *J. Biol. Chem.* 270 (37):21990-21990 (1995); documento WO2003/101283 (Reivindicación 14); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 287-288); documento WO2002/101075 (Reivindicación 4; Página 308-309); documento WO2002/71928 (Página 320-321); documento WO94/10312 (Página 52-57); Referencias cruzadas: MIM:601051; NP_005814.2; NM_005823_1

30 (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIB, SLC34A2, familia 34 de transportadores de soluto (fosfato sódico), transportador 3b de fosfato dependiente de sodio de tipo II, miembro 2, número de acceso en Genbank NM_006424) *J. Biol. Chem.* 277 (22): 19665 - 19672 (2002), *Genomics* 62 (2):281 - 284 (1999), Feild, J.A., et al (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578 - 582; documento WO2004022778 (Reivindicación 2); documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 326); EP875569 (Reivindicación 1; Página 17 - 19); documento WO20015718 (Reivindicación 20; Página 329); documento WO2004032842 (Ejemplo IV); documento WO200175177 (Reivindicación 24; Página 139 - 140); Referencias cruzadas: MIM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1

35 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B, nº de acceso en Genbank AB040878); Nagase T., et al. (2000) *DNA Res.* 7 (2):143-150; documento WO2004/000997 (Reivindicación 1); documento WO2003/003984 (Reivindicación 1); documento WO2002/06339 (Reivindicación 1; Página 50); documento WO2001/88133 (Reivindicación 1; Página 4143, 4858); documento WO2003/054152 (Reivindicación 20); documento WO2003/101400 (Reivindicación 11); Acceso: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;

40 (8) PSCA hlg (gen 2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12, nº de acceso en Genbank AY358628); documento US2003129192 (Reivindicación 2); documento US2004044180 (Reivindicación 12); documento US2004044179 (Reivindicación 11); documento US2003096961 (Reivindicación 11); documento US2003232056 (Ejemplo 5); documento WO2003105758 (Reivindicación 12); documento US2003206918 (Ejemplo 5); documento E1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003025148 (Reivindicación 20); Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628_1

45 (9) ETBR (receptor de endotelina de tipo B, N° de acceso en Genbank AY275463); Nakamuta M., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 3439, 1991; Ogawa Y., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248255, 1991; Arai H., et al. *Jpn. Circ. J.* 56, 13031307, 1992; Arai H., et al. *J. Biol. Chem.* 268, 34633470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 656663, 1991; Elshourbagy N.A., et al. *J. Biol. Chem.* 268, 38733879, 1993; Haendler B., et al. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al. *Gene* 228, 4349, 1999; Strausberg R.L., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1689916903, 2002; Bourgeois C., et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 31163123, 1997; Okamoto Y., et al. *Biol. Chem.* 272, 2158921596, 1997;

50 Verheij J.B., et al. *Am. J. Med. Genet.* 108, 223225, 2002; Hofstra R.M.W., et al. *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180185, 1997; Puffenberger E.G., et al. *Cell* 79, 12571266, 1994; Attie T., et al., *Hum. Mol. Genet.* 4, 24072409, 1995;

55

60

65

Auricchio A., et al. *Hum. Mol. Genet.* 5:351354, 1996; Amiel J., et al. *Hum. Mol. Genet.* 5, 355357, 1996; Hofstra R.M.W., et al. *Nat. Genet.* 12, 445447, 1996; Svensson P.J., et al. *Hum. Genet.* 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al. *Mol. Med.* 7, 115124, 2001; Pingault V., et al. (2002) *Hum. Genet.* 111, 198206; documento WO2004/045516 (Reivindicación 1); documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/040000 (Reivindicación 151); documento WO2003/087768 (Reivindicación 1); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/61087 (Fig. 1); documento WO2003/016494 (Fig 6); documento WO2003/025138 (Reivindicación 12; Página 144); documento WO2001/98351 (Reivindicación 1; Página 124125); documento EP0522868 (Reivindicación 8; Fig 2); documento WO2001/77172 (Reivindicación 1; Página 297299); documento US2003/109676; documento US6518404 (Fig 3); documento US5773223 (Reivindicación 1a; Col 3134); documento WO2004/001004; (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, nº de acceso en Genbank NM_017763); documento WO2003/104275 (Reivindicación 1); documento WO2004/046342 (Ejemplo 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2003/083074 (Reivindicación 14; Página 61); documento WO2003/018621 (Reivindicación 1); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig 93); documento WO2001/66689 (Ejemplo 6); Referencias cruzadas: LocusID:54894; NP_060233.2; NM_017763_1 (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociada con el cáncer de próstata, proteína 1 asociada con el cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales transmembrana de próstata 2, seis proteínas prostáticas transmembrana, nº de acceso en Genbank AF455138); *Lab. Invest.* 82 (11):15731582 (2002); documento WO2003/087306; documento US2003/064397 (Reivindicación 1; Fig. 1); documento WO2002/72596 (Reivindicación 13; Página 5455); documento WO2001/72962 (Reivindicación 1; Fig. 4B); documento WO2003/104270 (Reivindicación 11); documento WO2003/104270 (Reivindicación 16); documento US2004/005598 (Reivindicación 22); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/060612 (Reivindicación 12; Fig. 10); documento WO2002/26822 (Reivindicación 23; Fig. 2); documento WO2002/16429 (Reivindicación 12; Fig. 10); Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138_1 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, nº de acceso en Genbank NM_017636); Xu, X.Z., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (19):1069210697 (2001), *Cell* 109 (3):397407 (2002), *J. Biol. Chem.* 278 (33):3081330820 (2003); documento US2003/143557 (Reivindicación 4); documento WO2000/40614 (Reivindicación 14; Página 100103); documento WO2002/10382 (Reivindicación 1; Fig.9A); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2002/30268 (Reivindicación 27; Página 391); documento US2003/219806 (Reivindicación 4); documento WO2001/62794 (Reivindicación 14; Fig.1A-D); Referencias cruzadas: MIM:606936; NP_060106.2; NM_017636_1 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, nº de acceso en Genbank NP_003203 o NM_003212); Ciccodicola, A., et al. *EMBO J.* 8 (7):1987-1991 (1989), *Am. J. Hum. Genet.* 49 (3):555565 (1991); documento US2003/224411 (Reivindicación 1); documento WO2003/083041 (Ejemplo 1); documento WO2003/034984 (Reivindicación 12); documento WO2002/88170 (Reivindicación 2; Página 5253); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig.58); documento WO2002/16413 (Reivindicación 1; Página 9495, 105); documento WO2002/22808 (Reivindicación 2; Fig.1); documento US5854399 (Ejemplo 2; Col 1718); documento US5792616 (Fig.2); Referencias cruzadas: MIM:187395; NP_003203.1; NM_003212_1 (14) CD21 (CR2 (receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 nº de acceso M26004); Fujisaku et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):21182125; Weis J.J., et al. *J. Exp. Med.* 167, 10471066, 1988; Moore M., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 91949198, 1987; Barel M., et al. *Mol. Immunol.* 35, 10251031, 1998; Weis J.J., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 56395643, 1986; Sinha S.K., et al. (1993) *J. Immunol.* 150, 53115320; documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento US2004/005538 (Ejemplo 1); documento WO2003/062401 (Reivindicación 9); documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento WO91/02536 (Fig.9.9-9.9); documento WO2004/020595 (Reivindicación 1); Acceso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1. (15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (beta asociado con inmunoglobulina), B29, nº de acceso en Genbank NM_000626 o 11038674); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 100 (7):41264131, *Blood* (2002) 100 (9):30683076, Muller et al. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6):16211625; documento WO2004/016225 (Reivindicación 2, Fig.140); documento WO2003/087768, documento US2004/101874 (Reivindicación 1, Página 102); documento WO2003/062401 (Reivindicación 9); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento US2002/150573 (Reivindicación 5, Página 15); documento US5644033; documento WO2003/048202 (Reivindicación 1, Páginas 306 y 309); documentos WO 99/558658, US6534482 (Reivindicación 13, Fig.17A/B); documento WO2000/55351 (Reivindicación 11, Páginas 1145-1146); Referencias cruzadas: MIM: 147245; NP_000617.1; NM_000626_1 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, nº de acceso en Genbank NM_030764); *Genome Res.* 13 (10):22652270 (2003), *Immunogenetics* 54 (2):8795 (2002), *Blood* 99 (8):26622669 (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (17):97729777 (2001), Xu, M.J., et al. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (3):768775; documento WO2004/016225 (Reivindicación 2); documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (Reivindicación 5; Fig.18D-1-18D-2); documento WO2003/097803 (Reivindicación 12); documento WO2003/089624 (Reivindicación 25); Referencias cruzadas: MIM:606509; NP_110391.2; NM_030764_1 (17) HER2 (ErbB2, nº de acceso en Genbank M11730); Coussens L., et al. *Science* (1985) 230(4730):1132-1139; Yamamoto T., et al. *Nature* 319, 230234, 1986; Semba K., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6497-

6501, 1985; Swiercz J.M., et al. *J. Cell Biol.* 165, 869880, 2004; Kuhns J.J., et al. *J. Biol. Chem.* 274, 3642236427, 1999; Cho H.-S., et al. *Nature* 421, 756760, 2003; Ehsani A., et al. (1993) *Genomics* 15, 426429; documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/027049 (Fig.1I); documento WO2004/009622; documento WO2003/081210; documento WO2003/089904 (Reivindicación 9); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento US2003/118592; documento WO2003/008537 (Reivindicación 1); documento WO2003/055439 (Reivindicación 29; Fig.1A-B); documento WO2003/025228 (Reivindicación 37; Fig.5C); documento WO2002/22636 (Ejemplo 13; Página 95107); documento WO2002/12341 (Reivindicación 68; Fig.7); documento WO2002/13847 (Página 7174); documento WO2002/14503 (Página 114117); documento WO2001/53463 (Reivindicación 2; Página 4146); documento WO2001/41787 (Página 15); documento WO2000/44899 (Reivindicación 52; Fig.7); documento WO2000/20579 (Reivindicación 3; Fig.2); documento US5869445 (Reivindicación 3; Col 3138); documento WO9630514 (Reivindicación 2; Página 5661); documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004/043361 (Reivindicación 7); documento WO2004/022709; documento WO2001/00244 (Ejemplo 3; Fig.4); Acceso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1. los anticuerpos anti-HER2 incluyen: HERCEPTIN® (trastuzumab, huMAB4D5 - 8) un antiHER2 humanizado de longitud completa (PM 145167); trastuzumab F(ab')₂ = derivado de anti-HER2 enzimáticamente (PM 100.000), 4D5 = antiHER2 murino de longitud completa, de hibridoma, rhu4D5 = anticuerpo humanizado de longitud completa expresado de forma transitoria, rhuFab4D5 = Fab humanizado recombinante (PM 47738), 4D5Fc8 = antiHER2 murino de longitud completa, con el dominio de unión FcRn mutado, huMAB4D5 - 1, huMAB4D5 - 2, huMAB4D5 - 3, huMAB4D5 - 4, huMAB4D5 - 5, huMAB4D5 - 6, huMAB4D5 - 7 y (trastuzumab).

(18) NCA (CEACAM6, n° de acceso Genbank M18728); Barnett T., et al. *Genomics* 3, 5966, 1988; Tawaragi Y., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 8996, 1988; Strausberg R.L., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:1689916903, 2002; documento WO2004/063709; documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004/044178 (Ejemplo 4); documento WO2004/031238; documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento WO2002/86443 (Reivindicación 27; Página 427); documento WO2002/60317 (Reivindicación 2); Acceso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728; (19) MDP (DPEP1, N° de acceso en Genbank BC017023); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26):1689916903 (2002); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/64798 (Reivindicación 33; Página 8587); documento JP05003790 (Fig 68); documento WO99/46284 (Fig 9); Referencias cruzadas: MIM: 179780; AAH17023.1; BC017023_1

(20) IL20Rα (IL20Ra, ZCYTOR7, N° de acceso en Genbank AF184971); Clark H.F., et al. *Genome Res.* 13, 22652270, 2003; Mungall A.J., et al. *Nature* 425, 805811, 2003; Blumberg H., et al. *Cell* 104, 919, 2001; Dumoutier L., et al. *J. Immunol.* 167, 35453549, 2001; Parrish-Novak J., et al. *J. Biol. Chem.* 277, 4751747523, 2002; Pletnev S., et al. (2003) *Biochemistry* 42:1261712624; Sheikh F., et al. (2004) *J. Immunol.* 172, 20062010; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004/005320 (Ejemplo 5); documento WO2003/029262 (Página 7475); documento WO2003/002717 (Reivindicación 2; Página 63); documento WO2002/22153 (Página 4547); documento US2002/042366 (Página 2021); documento WO2001/46261 (Página 5759); documento WO2001/46232 (Página 6365); documento WO98/37193 (Reivindicación 1; Página 5559); Acceso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

(21) Brevican (BCAN, BEHAB, N° de acceso en Genbank AF229053); Gary S.C., et al. *Gene* 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al. *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1689916903, 2002; documento US2003/186372 (Reivindicación 11); documento US2003/186373 (Reivindicación 11); documento US2003/119131 (Reivindicación 1; Fig.52); documento US2003/119122 (Reivindicación 1; Fig.52); documento US2003/119126 (Reivindicación 1); documento US2003/119121 (Reivindicación 1; Fig.52); documento US2003/119129 (Reivindicación 1); documento US2003/119130 (Reivindicación 1); documento US2003/119128 (Reivindicación 1; Fig.52); documento US2003/119125 (Reivindicación 1); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/02634 (Reivindicación 1);

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, N° de acceso Genbank NM_004442); Chan, J. y Watt, V.M., *Oncogene* 6 (6), 10571061 (1991) *Oncogene* 10 (5):897905 (1995), *Annu. Rev. Neurosci.* 21:309345 (1998), *Int. Rev. Cytol.* 196:177244 (2000); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200053216 (Reivindicación 1; Página 41); documento WO2004065576 (Reivindicación 1); documento WO2004020583 (Reivindicación 9); documento WO2003004529 (Página 128-132); documento WO200053216 (Reivindicación 1; Página 42); Referencias cruzadas: MIM:600997; NP_004433.2; NM_004442_1

(23) ASLG659 (B7h, N° de acceso Genbank AX092328); documento US2004/0101899 (Reivindicación 2); documento WO2003104399 (Reivindicación 11); documento WO2004000221 (Fig.3); documento US2003/165504 (Reivindicación 1); documento US2003/124140 (Ejemplo 2); documento US2003/065143 (Fig.60); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 299); documento US2003/091580 (Ejemplo 2); documento WO2002/10187 (Reivindicación 6; Fig.10); documento WO2001/94641 (Reivindicación 12; Fig.7b); documento WO2002/02624 (Reivindicación 13; Fig.1A-1B); documento US2002/034749 (Reivindicación 54; Página 4546); documento WO2002/06317 (Ejemplo 2; Página 320321, Reivindicación 34; Página 321322); documento WO2002/71928 (Página 468469); documento WO2002/02587 (Ejemplo 1; Fig.1); documento WO2001/40269 (Ejemplo 3; Páginas 190192); documento WO2000/36107 (Ejemplo 2; Página 205207); documento WO2004/053079 (Reivindicación 12); documento WO2003/004989 (Reivindicación 1); documento WO2002/71928 (Página 233234, 452453); documento WO 01/16318;

(24) PSCA (precursor del antígeno de células madre prostáticas, n° de acceso en Genbank AJ297436); Reiter R.E., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 17351740, 1998; Gu Z., et al. *Oncogene* 19, 12881296, 2000; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) 275(3):783788; WO2004/022709; EP1394274 (Ejemplo 11);

- documento US2004/018553 (Reivindicación 17); documento WO2003/008537 (Reivindicación 1); documento WO2002/81646 (Reivindicación 1; Página 164); documento WO2003/003906 (Reivindicación 10; Página 288); documento WO2001/40309 (Ejemplo 1; Fig.17); documento US2001/055751 (Ejemplo 1; Fig.1b); documento WO2000/32752 (Reivindicación 18; Fig.1); documento WO98/51805 (Reivindicación 17; Página 97); documento WO98/51824 (Reivindicación 10; Página 94); documento WO98/40403 (Reivindicación 2; Fig.1B); Acceso: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1
- 5 (25) GEDA (nº de acceso en Genbank AY260763); AAP14954 proteína de tipo pareja de fusión de lipoma/pid=AAP14954.1 – especie Homo sapiens: Homo sapiens (humano) documento WO2003054152 (Reivindicación 20); documento WO2003000842 (Reivindicación 1); documento WO2003023013 (Ejemplo 3, Reivindicación 20); documento US2003194704 (Reivindicación 45); Referencias cruzadas: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763_1
- 10 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor de BLyS 3, BR3, nº de acceso en Genbank NP_443177.1); NP_443177 receptor de BAFF /pid=NP_443177.1 - Homo sapiens; Thompson, J.S., et al Science 293 (5537), 2108 - 2111 (2001); documento WO2004058309; documento WO2004011611; documento WO2003045422 (Ejemplo; Página 32 - 33); documento WO2003014294 (Reivindicación 35; Fig 6B); documento WO2003035846 (Reivindicación 70; Página 615 - 616); documento WO200294852 (Col 136 - 137); documento WO200238766 (Reivindicación 3; Página 133); documento WO200224909 (Ejemplo 3; Fig 3); Referencias cruzadas: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1
- 15 (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de los linfocitos B, nº de acceso en Genbank NP-001762.1); Stamenkovic, I. y Seed, B., Nature 345 (6270), 74 - 77 (1990); documento US2003157113; documento US2003118592; documento WO2003062401 (Reivindicación 9); documento WO2003072036 (Reivindicación 1; Fig. 1); documento WO200278524 (Ejemplo 2); Referencias cruzadas: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1
- 20 (28) CD79a (CD79A, CD79 α , alfa asociada con inmunoglobulina, una proteína específica de células B que interacciona covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de Ig M, transducir una señal implicada en la diferenciación de las células B), SECUENCIA DE PROTEÍNAS completa mpgggv...dvqlekp (1..226; 226 aa), pl: 4,84, PM: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma génico: 19q13.2, nº de acceso en Genbank NP_001774.10) documento WO2003088808, documento US20030228319; documento WO2003062401 (reivindicación 9); documento US2002150573 (reivindicación 4, páginas 13 - 14); documento WO9958658 (reivindicación 13, Fig 16); documento WO9207574 (Fig 1); documento US5644033; Ha et al (1992) J. Immunol. 148(5):1526 - 1531; Mueller et al (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621 - 1625; Hashimoto et al (1994) Immunogenetics 40(4):287 - 295; Preud'homme et al (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141 - 146; Yu et al (1992) J. Immunol. 148(2) 633 - 637; Sakaguchi et al (1988) EMBO J. 7(11):3457 - 3464;
- 25 (29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a proteína G que está activado por la quimioquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y, quizá, el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia) SECUENCIA DE PROTEÍNAS completa mnyptl...atstltf (1..372; 372 aa), pl: 8.54 PM: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma génico: 11q23.3, nº de acceso en Genbank NP_001707.1); documento WO2004/040000; documento WO2004/015426; documento US2003/105292 (Ejemplo 2); documento US6555339 (Ejemplo 2); documento WO2002/61087 (Fig.1); documento WO2001/57188 (Reivindicación 20, Página 269); documento WO2001/72830 (Páginas 1213); documento WO2000/22129 (Ejemplo 1, Páginas 152153, Ejemplo 2, Páginas 254256); documento WO99/28468 (Reivindicación 1, Página 38); documento US5440021 (Ejemplo 2, col 4952); documento WO94/28931 (Páginas 5658); documento WO92/17497 (Reivindicación 7, Fig.5); Dobner et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22:27952799; Barella et al. (1995) Biochem. J. 309:773-779;
- 30 (30) HLA-DOB (subunidad Beta de la molécula de clase II del MHC (antígeno Ia) que se une a los péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+) SECUENCIA DE PROTEÍNAS completa mgsgwvp...vllpqsc (1..273; 273 aa, pl: 6,56 PM: 30820 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 6p21.3, Nº de acceso en Genbank NP_002111.1); Tonnellet et al. (1985) EMBO J. 4(11):28392847; Jonsson et al. (1989) Immunogenetics 29(6):411413; Beck et al. (1992) J. Mol. Biol. 228:433441; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:1689916903; Serenius et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:87598766; Beck et al. (1996) J. Mol. Biol. 255:113; Naruse et al. (2002) Tissue Antigens 59:512519; WO99/58658 (Reivindicación 13, Fig 15); documento US6153408 (Col 3538); documento US5976551 (col 168170); documento US6011146 (col 145146); Kasahara et al. (1989) Immunogenetics 30(1):6668; Larhammar et al. (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119;
- 35 (31) P2X5 (canal iónico 5 dependiente de ligando P2X del receptor purinérgico, un canal iónico dependiente de ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad idiopática del detector) SECUENCIA DE PROTEÍNAS completa mgqagck...lephrst (1..422; 422 aa), pl: 7,63, PM: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 17p13.3, Nº de acceso en Genbank NP_002552.2); Le et al. (1997) FEBS Lett. 41R(1 - 2):195 - 199; documento WO2004/047749; documento WO2003/072035 (Reivindicación 10); Touchman et al. (2000) Genome Res. 10:165 - 173; documento WO200222660 (reivindicación 20); documento WO2003093444 (reivindicación 1); documento WO2003087768 (reivindicación 1); documento WO2003029277 (página 82);
- 40 (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de las células B CD72, Lyb-2); SECUENCIA DE PROTEÍNAS completa maeaity...tafrfpd (1..359; 359 aa), pl: 8,66, PM: 40225 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 9p13.3, Nº de acceso en Genbank NP_001773.1); documento WO2004042346 (Reivindicación 65); documento WO2003/026493 (Páginas 5152, 5758); documento WO2000/75655 (Páginas 105-106); Von Hoegen et al. (1990) J. Immunol. 144(12):48704877; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:1689916903.
- 45
50
55
60
65

- (33) LY64 (antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de células B, la pérdida de función está asociada con un incremento de la actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico); SECUENCIA DE PROTEÍNAS completa mafdvsc...rwkyqhi (1..661; 661 aa), pl: 6,20, PM: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 5q12, Nº de acceso en Genbank NP_005573.1); documento US2002/193567; documento WO97/07198 (Reivindicación 11, Páginas 39-42); Miura et al. (1996) Genomics 38(3):299304; Miura et al. (1998) Blood 92:28152822; documento WO2003/083047; documento WO97/44452 (Reivindicación 8, Páginas 5761); documento WO2000/12130 (Páginas 24-26);
- (34) FCRH1 (proteína 1 similar al receptor de Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulina que contiene los dominios ITAM y similar a Ig de tipo C2, pueden tener un papel en la diferenciación de linfocitos B); SECUENCIA DE PROTEÍNAS completa mlprll...vdyedam (1..429; 429 aa), pl: 5,28, PM: 46925 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21-1q22, Nº de acceso Genbank NP_443170.1); WO2003/077836; documento WO2001/38490 (Reivindicación 6, Fig 18E-118-E-2); Davis et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):97729777; documento WO2003/089624 (Reivindicación 8); documento EP1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003/089624 (Reivindicación 7);
- (35) IRTA2 (receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas asociado con la translocación, un inmunoreceptor putativo con posibles papeles en el desarrollo de las células B y la linfomagénesis; en algunas neoplasias de células B se produce alteración de la regulación del gen mediante translocación) SECUENCIA DE PROTEÍNAS completa mllwvil...assaphr (1..977; 977 aa), pl: 6,88 PM: 106468 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21, nº de acceso en Genbank NP_112571.1) documento WO2003024392 (reivindicación 2, Fig. 97); Nakayama et al (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1): 124 - 127; documento WO2003077836; documento WO200138490 (reivindicación 3, Fig. 18B-1 - 18B-2)
- (36) TENB2 (TMEFF2, tomorregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano transmembrana putativo, relacionado con la familia de EGF/herregulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, Acceso en NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; nº de acceso en Genbank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436. documento WO2004074320; documento JP2004113151; documento WO2003042661; documento WO2003009814; documento EP1295944 (páginas 69 - 70); documento WO200230268 (página 329); documento WO200190304; documento US2004249130; documento US2004022727; documento WO2004063355; documento US2004197325; documento US2003232350; documento US2004005563; documento US2003124579; Horie et al (2000) Genomics 67:146 - 152; Uchida et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593 - 602; Liang et al (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynne-Jones et al. (2001) Int J Cancer. Oct 15;94(2): 178 - 84.

El anticuerpo de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de fórmula I puede unirse específicamente a un receptor codificado por un gen de ErbB. El anticuerpo puede unirse específicamente a un receptor ErbB seleccionado de EGFR, HER2, HER3 y HER4. El ADC puede unirse específicamente al dominio extracelular del receptor HER2 e inhibir el crecimiento de las células tumorales que sobreexpresan el receptor HER2. HERCEPTIN® (trastuzumab) se une selectivamente al dominio extracelular (DEC) de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano HER2 (ErbB2) (documento US 5821337; documento US 6054297; documento US 6407213; documento US 6639055; Coussens et al (1985) Science 230:1132 - 9; Slamon, et al (1989) Science 244:707 - 12). Trastuzumab es un anticuerpo IgG1 kappa que contiene regiones marco humanas con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo murino (4D5) que se une a HER2. Trastuzumab se une al antígeno HER2 y, por lo tanto, inhibe la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan HER2 (Hudziak RM, et al Cell Biol (1989) Mol 9: 1165-72; Lewis GD, et al (1993) Cancer Immunol Immunother; 37: 255-63; Baselga J, et al (1998) Cancer Res. 58:2825 - 2831).

Los anticuerpos pueden marcarse o conjugarse con las enzimas que catalizan una alteración química de un sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Como alternativa, una enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Se conocen técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química, tal como la escisión de un enlace O-O de un grupo dioxetano, y, después, puede emitir luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o donar energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; documento US 4737456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan et al, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, en Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147 - 166(1981).

Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo: (i) peroxidasa de rábano (HRP) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, en la que la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilen diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5-tetrametilbencidina (TMB)); (ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y (iii) β -D-galactosidasa 5 β -D-Gal con un sustrato

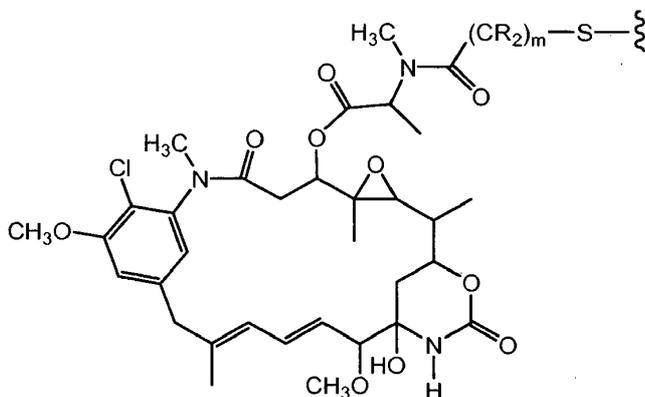
cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil-β-D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-β-D-galactosidasa. Otras numerosas combinaciones de enzima-sustrato se encuentran disponibles para los expertos en la técnica (documento US 4275149; documento US 4318980).

- 5 El marcador puede conjugarse indirectamente o no covalentemente con el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las categorías de marcadores mencionados anteriormente puede conjugarse con avidina, estreptavidina incluyendo, o *viceversa*. La biotina se une selectivamente a la avidina y, por lo tanto, el marcador se puede conjugar con la variante polipeptídica de esta manera indirecta.

10 RESTOS DE FÁRMACO

- El resto de fármaco (D) de los conjugados de anticuerpo-fármaco de fórmula I (ADC) incluye cualquier compuesto, resto o grupo que tiene un efecto citotóxico o citostático. Los restos de fármacos incluyen agentes quimioterapéuticos, que pueden funcionar como inhibidores de microtubulina, inhibidores de la mitosis, inhibidores de la topoisomerasa, o intercaladores de ADN, y, en particular, los que se utilizan para la terapia del cáncer. Los restos de fármaco en los conjugados de anticuerpo-fármaco de Fórmula I pueden tener otros mecanismos de acción y no están limitados a ninguno de estos mecanismos.

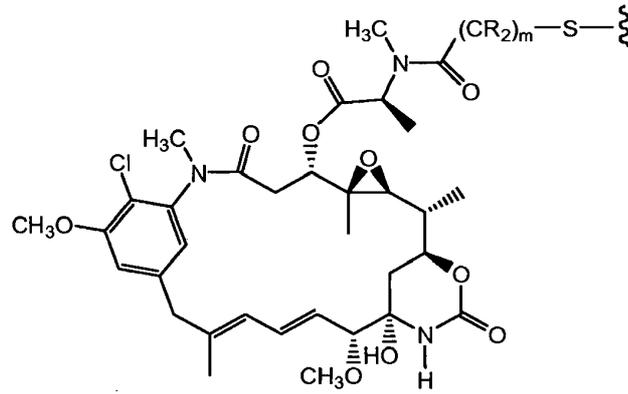
- 20 El resto de fármaco (D) de los conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC) de fórmula I incluye maitansinoides que tienen la estructura:



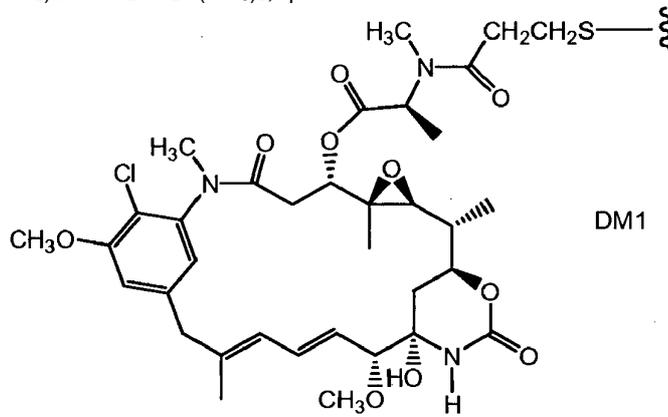
- 25 donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre de D a un enlazador (L) de un conjugado de fármaco-anticuerpo (ADC). R puede ser independientemente H o un alquilo C₁-C₆. La cadena de alquileo que une el grupo amida al átomo de azufre puede ser metilo, etilo, o propilo, es decir, m es 1, 2, o 3.

- Los compuestos de maitansina inhiben la proliferación celular mediante la inhibición de la formación de microtúbulos durante la mitosis a través de la inhibición de la polimerización de la proteína microtubular, tubulina (Remillard et al (1975) Science 189:1002 - 1005; US 5208020). La maitansina se aisló del arbusto de África del este *Maytenus serrata* y se ha demostrado que es de 100 a 1000 veces más citotóxica que los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer convencionales como metotrexato, daunorrubicina y vincristina (documento US 3896111). Posteriormente, se descubrió que algunos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (documento US 4151042). También se han notificado los ésteres C-3 sintéticos de maitansinol y análogos de maitansinol (Kupchan et al., (1978) J. Med. Chem. 21:31 - 37; Higashide et al. (1977) Nature 270:721 - 722; Kawai et al., 32 Chem. Pharm. (1984) Bull. 3441 - 3451). Los análogos de maitansinol a partir de los cuales se han preparado ésteres C-3 incluyen maitansinol con modificaciones en el anillo aromático (por ejemplo de cloro) o en el C-9, C-14 (por ejemplo, grupo metilo hidroxilado), C-15, C-18, C -20 y C-4,5. Los ésteres C-3 de origen natural y sintéticos se pueden clasificar en dos grupos: (a) ésteres C-3 con ácidos carboxílicos simples (documento US 4248870; documento US 4265814; documento US 4308268; documento US 4308269; documento US 4309428; documento US 4317821; documento US 4322348; y documento US 4331598), y (b) ésteres C-3 con derivados de N-metil-L-alanina (documento US 4137230 y documento US 4260608; y Kawai et al., (1984) Chem. Pharm. Bull. 32:3441 - 3451). Se encontró que los ésteres del grupo (b) son mucho más citotóxicos que los ésteres del grupo (a).

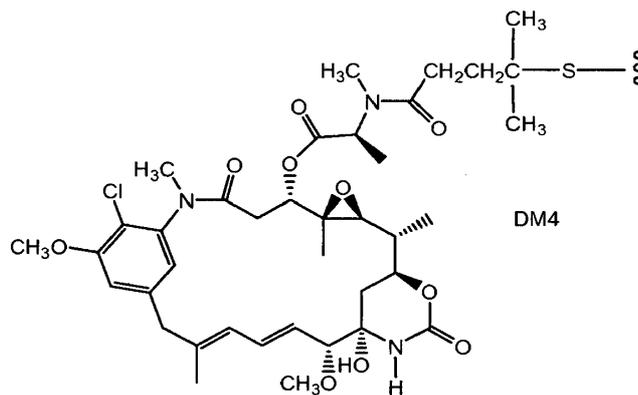
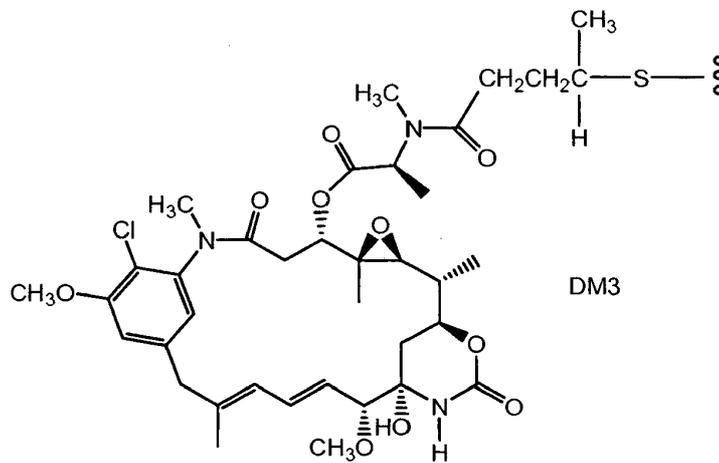
- 45 Como ocurre con otros restos de fármaco, todos los estereoisómeros del resto de fármaco maitansinoide se contemplan para los compuestos, es decir, cualquier combinación de configuraciones R y S en los carbonos quirales de D. En una realización, el resto de fármaco maitansinoide (D) tendrá la siguiente estereoquímica:



Ejemplos de realización de restos de fármaco de maitansinoide incluyen: DM1, $(CR_2)_m = CH_2CH_2$; DM3, $(CR_2)_m = CH_2CH_2CH(CH_3)$; y DM4, $(CR_2)_m = CH_2CH_2C(CH_3)_2$, que tienen las estructuras:



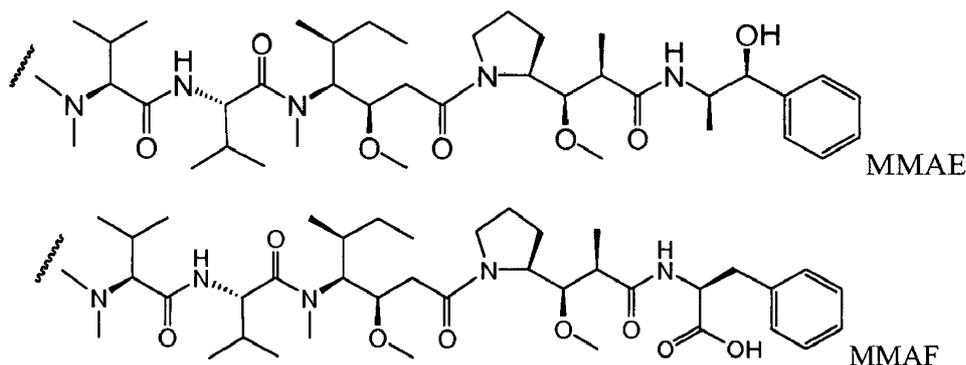
5



10

El resto de fármaco (D) de los conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC) de fórmula I incluye también dolastatinas y sus análogos y derivados peptídicos, las auristatinas (patentes de EE.UU. N° 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP, y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580 - 3584) y tienen actividad anticancerosa (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961 - 2965). Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), los análogos sintéticos de dolastatina (documento WO 02/088172), se han conjugado como restos de fármaco a: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico para CD30 en neoplasias hematológicas (Klussman, et al (2004) *Bioconjugate Chemistry* 15 (4): 765-773; Doronina et al (2003) *Nature Biotechnology* 21 (7): 778-784; Francisco et al (2003) *Blood* 102 (4): 1458-65; documento US 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti-CD20, tales como Rituxan (documento WO 04/032828) para el tratamiento de los cánceres que expresan CD20 y trastornos inmunes; (iv) anticuerpo anti-EphB2R 2H9 para el tratamiento del cáncer colorrectal (Mao et al (2004) *Cancer Research* 64(3):781 - 788); (v) de anticuerpos E-selectina (Bhaskar et al (2003) *Cancer Res.* 63:6387 - 6394); (vi) trastuzumab (HERCEPTIN®, documento US 2005/0238649), y (vii) anticuerpos anti-CD30 (documento WO 03/043583). Las variantes de auristatina E se divulgan en los documentos US 5767237 y US 6124431, incluyendo monometilauristatina E conjugada con anticuerpos monoclonales (Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Resumen Número 623, presentado el 28 de marzo 2004). Los análogos de auristatina MMAE y MMAF se han conjugado con diversos anticuerpos (documento US 2005/0238649).

El resto de fármaco monometilauristatina (D) de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de fórmula I incluyen los restos de fármaco auristatina MMAE (documento US 7090843) y MMAF (documento US 2005/0238649). El extremo N del resto de fármaco MMAE o MMAF se une covalentemente mediante un enlazador a una cisteína modificada por ingeniería del anticuerpo.



Otros restos de fármaco auristatina de ejemplo incluyen compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones de fenilalanina carboxi en el extremo C del resto de fármaco auristatina pentapéptido (documento WO 2007/008848) y los compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones en la cadena lateral de fenilalanina en el extremo C del pentapéptido resto de fármaco auristatina (documento WO 2007/008603).

ENLAZADORES

Un enlazador es un resto químico bifuncional o multifuncional que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo (Ab) a un resto farmacológico (D) de acuerdo con los conjugados anticuerpo-fármaco de fórmula I. Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) se pueden preparar de forma conveniente usando un enlazador (L) que tiene una funcionalidad reactiva para la unión al fármaco y al anticuerpo. Un enlazador puede tener un grupo electrófilo reactivo con un grupo nucleófilo presente en un anticuerpo, tal como tiol o amino. Un tiol de cisteína del anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en un Enlazador y forma un enlace covalente con un enlazador. Grupos electrofílicos útiles incluyen, pero no se limitan a, grupos de maleimida y de haloacetamida. Los enlazadores también incluyen un radical tal como un alquildilo, un arileno, un heteroarileno, restos tales como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_m-$, unidades repetitivas de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (p. ej., polietilnamino, Jeffamine™); y éster diácido y amidas, incluidos succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida. Grupos nucleofílicos útiles sobre un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino.

En otra realización, un reactivo enlazador o reactivo de fármaco-ligador tiene un grupo funcional nucleófilo reactivo que es reactivo con un electrófilo presente en un anticuerpo para formar un enlace covalente. Grupos electrófilos útiles sobre un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, grupos aldehído y cetona carbonilo. Grupos nucleofílicos útiles en un enlazador incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y arilhidrazida.

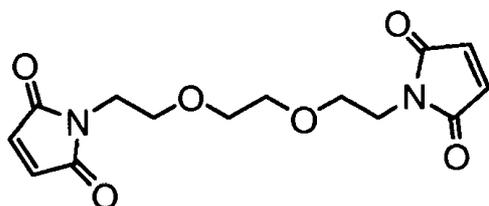
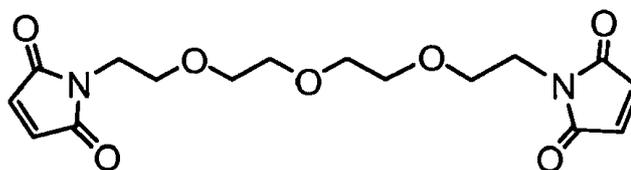
El enlazador puede estar compuesto por uno o más componentes enlazadores. Componentes de enlazadores de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproil ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe" o "af"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridiltio) ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC"), (4-yodo-acetil)aminobenzoato de de N-succinimidilo ("SIAB"), etilenoxi-CH₂CH₂O- como una o más unidades de repetición ("EO" o "PEO"). En la técnica se conocen componentes adicionales del enlazador y algunos se describen en el presente documento.

En una realización, el anticuerpo tiene uno o más restos de lisina que se pueden modificar químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilos. La unidad del anticuerpo se une a la unidad del enlazador a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo. Los reactivos que se pueden utilizar para modificar lisinas incluyen, pero no se limitan a, S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) y 2-iminotiolano clorhidrato (reactivo de Traut).

En otra realización, el anticuerpo puede tener uno o más grupos carbohidratos que se pueden modificar químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilos. La unidad del anticuerpo se une a al enlazador, tal como la unidad expansora, a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo. En aún otra realización, el anticuerpo puede tener uno o más grupos de hidratos de carbono que pueden oxidarse para proporcionar un grupo (-CHO) aldehído (véase, por ejemplo, Laguzza, et al (1989) J. Med. Chem. 32(3):548 - 55). El aldehído correspondiente puede formar un enlace con un sitio reactivo en un expansor. Los sitios reactivos en un expansor que pueden reaccionar con un grupo carbonilo en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidracina e hidroxilamina. Otros protocolos para la modificación de proteínas para la unión o asociación de unidades de fármaco se describen en Coligan et al., "Current Protocols in Protein Science", vol. 2, John Wiley & Sons (2002), que se incorpora en el presente documento por referencia.

En otra realización, el enlazador puede estar sustituido por grupos que modulan la solubilidad o la reactividad. Por ejemplo, un sustituyente cargado tales como sulfonato (-SO₃⁻) O de amonio, puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo enlazador con el anticuerpo o el resto de fármaco, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L (anticuerpo-enlazador) con D, o D-L (enlazador de fármacos reactivo) con Ab, dependiendo de la ruta sintética empleada para preparar el ADC.

Los compuestos de Fórmula I contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos reticulantes: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), e, incluyendo, reactivos de bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)₂, y BM(PEO)₃, que están disponibles comercialmente den Pierce Biotechnology, Inc. Los reactivos de bis-maleimida permiten la unión del grupo tiol de un residuo de cisteína de un anticuerpo a un resto de fármaco que contiene tiol, marcador o enlazador intermedio, de una manera secuencial o concurrente. Otros grupos funcionales además de maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo, resto de fármaco, marcador o enlazador intermedio incluyen yodoacetamida, bromoacetamida, piridina de vinilo, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato, e isotiocianato. Los reactivos enlazadores útiles también se pueden obtener a través de otras fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO), sintetizarse de acuerdo con los procedimientos descritos en Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866 - 1872; documento US 6214345 de Firestone et al; documento WO 02/088172; documento US 2003130189; documento US2003096743; documento WO 03/026577; documento WO 03/043583; y documento WO 04/032828.

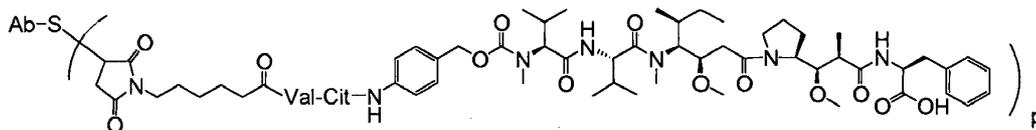
BM(PEO)₂BM(PEO)₃

Los grupos tiol reactivos de anticuerpos modificados con cisteína (documento US 2007/0092940) reaccionan con reactivos enlazadores o intermedios fármaco-enlazador, con grupos funcionales electrófilos tales como maleimida o α-halo-carbonilo, de acuerdo con el método de conjugación en la página 766 de Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765 - 773.

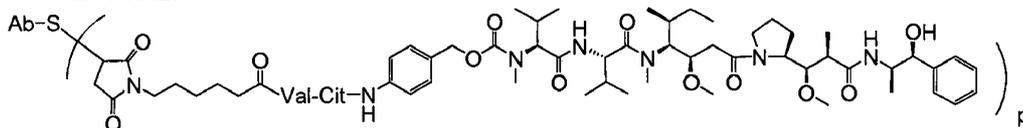
CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO

Ejemplos de ADC de Fórmula I incluyen restos de fármaco de monometilauristatina (D) MMAE y MMAF, y enlazadores que comprenden subunidades de maleimidocaproil (MC), valina-citrulina (vc), y para-aminobencilcarbamoilo (PAB), como se describe en el documento US 2005/0238649. Ejemplos de ADC incluyen:

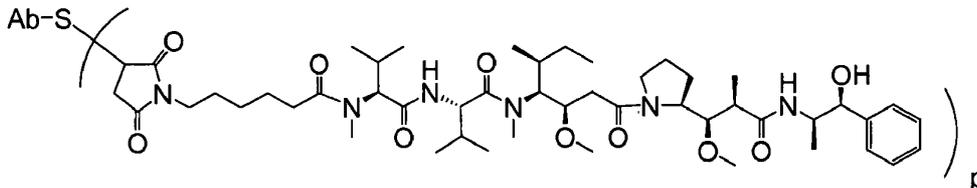
Ab-MC-vc-PAB-MMAF:



5 Ab-MC-vc-PAB-MMAE:

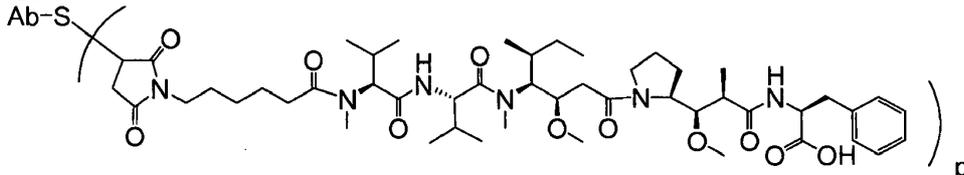


Ab-MC-MMAE:



10

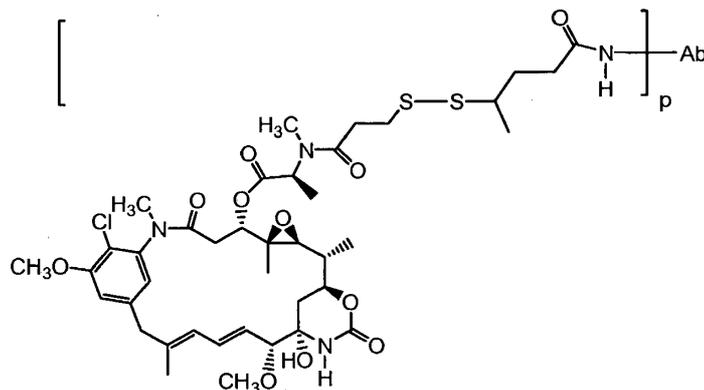
Ab-MC-MMAF:



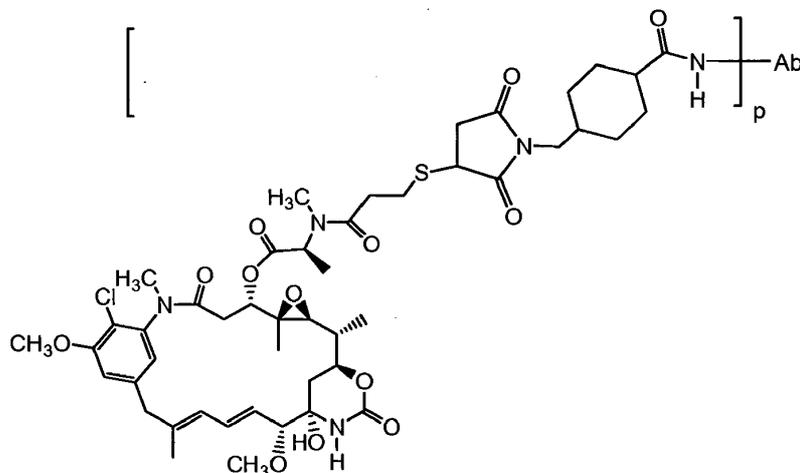
15 El ADC de monometilauristatina de ejemplo anterior puede prepararse a partir de un anticuerpo con un grupo tiol de cisteína reactivo, tal como un anticuerpo modificado con cisteína (documento US 2007/0092940) y reactivos enlazadores de fármacos MC-val-cit-PAB-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE, MC-MMAF, y MC-MMAE, respectivamente (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778 - 784; Francisco et al (2003) Blood 102:1458 - 1465; documento US 2005/0238649).

20 Ejemplos específicos de anticuerpos modificados con ingeniería y ADC correspondiente se muestran en la Figura 3, desde la parte superior a la parte inferior: dos restos farmacológicos MMAE situados en la cadena ligera - Tio Hu Anti HER2 4D5 LC V205C-MC-vc-PAB-MMAE; dos restos farmacológicos MMAE situados en la cadena pesada - Tio Hu Anti HER2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE; dos restos farmacológicos MMAE ubicados en la región Fc de la cadena pesada - Tio Hu Anti HER2 4D5 Fc S400C-MC-vc-PAB-MMAE; Tio Hu Anti HER2 4D5 Fc S400C; y un anticuerpo modificado con cisteína listo para la conjugación: Tio Hu Anti HER2 4D5 Fc S400C. Los anticuerpos modificados con cisteína están diseñados y seleccionados de acuerdo con el documento US 2007/0092940.

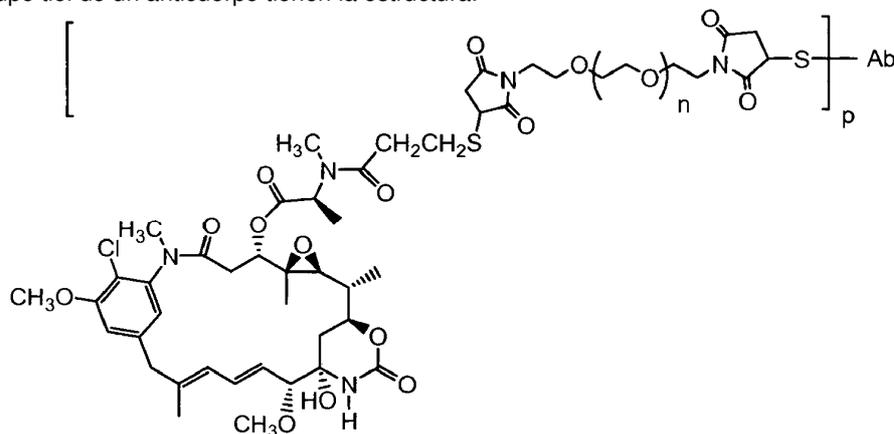
30 Ejemplos de ADC de Fórmula I incluyen restos de fármaco de maitansinoide (D) DM1, DM3, DM4 y los enlazadores formados a partir de reactivos enlazadores tales como SPP, SPDB, y SMCC, como se divulga en el documento US 2005/0276812. Los conjugados de anticuerpo-fármaco de ejemplo incluyen Ab-SPP-DM1:



Ab-SMCC-DM1:



- 5 Los conjugados de fármacos de anticuerpos de ejemplo en los que DM1 está unido a través de un enlazador BMPEO a un grupo tiol de un anticuerpo tienen la estructura:



10 en la que n es 0, 1, o 2; y p es 1, 2, 3, o 4.

CARGA DEL FÁRMACO

El valor de la carga de fármaco está representado por p , el número de restos de fármacos por anticuerpo en una molécula de fórmula I. Las composiciones de ADC de fórmula I incluyen mezclas de anticuerpos conjugados con una serie de fármacos, de 1 a aproximadamente 8. Las mezclas de conjugados de anticuerpo-fármaco resultantes de la conjugación de un anticuerpo y un reactivo de fármaco-enlazador, o de la conjugación de un anticuerpo-enlazador con un reactivo de fármaco, se pueden caracterizar como que tiene un valor promedio de carga de fármaco de aproximadamente 1 a aproximadamente 8, dependiendo de las condiciones de conjugación. Cada preparación de un ADC por conjugación de un anticuerpo a un resto de fármaco tiene como resultado una potencial distribución de las moléculas de producto, portando uno o más fármacos unidos a anticuerpo, o cuando el anticuerpo no se ha ligado a un resto de fármaco, donde $p = 0$. El número promedio de fármacos por anticuerpo en las preparaciones de ADC de reacciones de conjugación se puede caracterizar por los métodos de la presente invención, es decir, espectrometría de masas por afinidad, y mediante el ensayo de ELISA. Se puede determinar mediante ELISA, el valor medio de p en una preparación concreta de CAF (Hamblett et al (2004) Clinical Cancer Res. 10:7063 - 7070; Sanderson et al (2005) Clinical Cancer Res. 11:843 - 852). No obstante, la distribución de los valores p (fármaco) no se puede discernir por la unión anticuerpo-antígeno y la limitación de la detección de los ELISA. Asimismo, el ensayo ELISA para la detección de conjugados de anticuerpo-fármaco no determina donde se unen los restos de fármaco al anticuerpo, tal como los fragmentos de la cadena pesada o de la cadena ligera, o los residuos aminoacídicos concretos. Este parámetro importante de distribución se puede determinar por métodos de la presente invención con la separación de las moléculas individuales de una composición de ADC y su caracterización y cuantificación. La separación de los constituyentes de la muestra se produce tanto en la etapa de los medios de separación del método y durante la etapa de espectrometría de masas. La alta selectividad de la etapa de medios de separación de los métodos de la invención proporciona la separación y purificación de los componentes individuales de ADC a partir de muestras biológicas complejas y heterogéneas. La alta resolución y exactitud de la etapa de espectrometría de masas de los métodos de la invención proporciona la detección y cuantificación de los constituyentes de ADC

separados.

Los métodos de la invención pueden determinar la cantidad de fármaco unido por anticuerpo (carga) de ADC y la distribución de los restos de fármaco en fragmentos tales como la cadena pesada y la cadena ligera, e incluso para localizar restos de fármaco unidos covalentemente en loci de subfragmentos del anticuerpo, o en restos de aminoácidos particulares.

Para algunos ADC, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la fijación es un tiol de cisteína, como en los ejemplos de realización anteriores, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede fijar un enlazador. Los restos de aminoácidos menos reactivos, tales como lisina pueden ser más numerosos en el anticuerpo a conjugarse, pero pueden ser no reactivos y no estar disponibles para la reacción con el resto de fármaco o reactivo de fármaco-enlazador. Cargas mayores de fármaco, por ejemplo $p > 5$, pueden producir agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco.

Normalmente, menos del máximo teórico de los restos farmacológicos está conjugado con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos residuos de lisina que no reaccionan con el intermedio ligador del fármaco o reactivo ligador. Solo los grupos de lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo ligador reactivo con amina. Asimismo, solo los grupos de cisteína tiol más reactivos pueden reaccionar con un reactivo ligador reactivo con tiol. En general, los anticuerpos no contienen muchos, si contienen alguno, grupos de cisteína tiol libres y reactivos que pueden estar unidos a un resto farmacológico. La mayoría de cisteína tiol en los anticuerpos de los compuestos de la invención existe como puentes disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato (TCEP), en condiciones de reducción parcial o total. Adicionalmente, el anticuerpo puede ser sometido a condiciones de desnaturalización, o de desnaturalización parcial, para revelar grupos nucleofílicos reactivos, tales como lisina o cisteína. La carga (proporción fármaco/anticuerpo) de un CAF puede controlarse mediante varios parámetros, incluidos: (i) limitar el exceso molar del intermedio fármaco-ligador o el reactivo ligador respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo de la reacción de conjugación o la temperatura; y (iii) condiciones reductoras parciales o limitadas para la modificación de la cisteína tiol.

Cuando más de un grupo nucleófilo del anticuerpo reacciona con un intermedio ligador con fármaco, o reactivo ligador seguido del reactivo del resto farmacológico, el producto resultante es una mezcla de compuestos CAF con una distribución de restos de fármaco unidos a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3 etc. Los métodos de cromatografía líquida, tales como de fase inversa polimérica (PLRP) e interacción hidrófoba (HIC) pueden separar compuestos en la mezcla por valor de carga de fármaco. Se pueden aislar preparaciones de ADC con un solo valor la carga de fármaco (p) ("Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Hamblett, K.J., et al, Resumen nº 624, American Association for Cancer Research; 2004 Annual Meeting, March 27 - 31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; "Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates", Alley, S.C., et al, Resumen nº 627, American Association for Cancer Research; 2004 Annual Meeting, March 27 - 31, 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, March 2004). Sin embargo, estos ADC de valor de carga única todavía pueden ser mezclas heterogéneas debido a que los restos de fármaco pueden estar unidos, a través del enlazador, en diferentes sitios en el anticuerpo.

ADMINISTRACIÓN DE CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO

Los conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC) de Fórmula I pueden ponerse en contacto con, o se administran a, fuentes biológicas por cualquier vía apropiada a la afección a tratar. El ADC se administrará normalmente a un mamífero por vía parenteral, es decir, infusión, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural. Las fuentes biológicas que pueden ponerse en contacto, es decir, administrar, con el ADC de Fórmula I, incluyen: (i) mamíferos tales como un ratón, una rata, un conejo, un perro, un mono, o un ser humano; (ii) tejido de mamífero; y (iii) células cultivadas. Las muestras biológicas se recogen de la fuente biológica una vez, o a intervalos cronometrados, periódicos o aleatorios. Las muestras biológicas incluyen: (i) sangre, bilis, orina o heces; (ii) extractos de tejido; y (iii) medios de cultivo celular, lisados celulares o extractos celulares.

Los métodos de CL-EM de captura por afinidad de la invención se pueden emplear en el análisis de tejidos para determinar el mecanismo de toxicidad de los compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Las formulaciones farmacéuticas de conjugados terapéuticos de fármaco-anticuerpo (ADC) de Fórmula I se preparan normalmente para administración parenteral, es decir, bolo intravenoso, inyección intratumoral con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en una forma inyectable de dosificación unitaria. Un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que tiene el grado de pureza deseado está opcionalmente mezclado con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16ª edición, Osol, A. Ed), en forma de una formulación liofilizada o una solución acuosa.

Los diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables son no tóxicos para los receptores de la fuente biológica a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluidos goma guar y dextrinas; azúcares tales como glucosa, manosa, sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; agentes quelantes tales como EDTA; contra-iones formadores de sal tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína de Zn); y / o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, las formulaciones de anticuerpos anti-ErbB2 liofilizados se describen en el documento WO 97/04801, que se incorpora expresamente en este documento por referencia.

Los ingredientes farmacéuticos activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el ADC, en las que las matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (documento US 3773919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D - (-) -3-hidroxitúterico.

METABOLITOS DE LOS CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO

En el presente documento también se describen productos metabólicos *in vivo* de los compuestos de ADC descritos en el presente documento. Tales productos pueden resultar, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación, escisión enzimática, y similares, del compuesto administrado. De acuerdo con lo anterior, la divulgación incluye compuestos nuevos y no evidentes producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de Fórmula I con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo.

Los productos metabolitos normalmente pueden identificarse mediante la administración de la mezcla del conjugado anticuerpo-fármaco en una dosis detectable (por ejemplo, mayor que aproximadamente 0,5 mg / kg) a un animal tal como rata, ratón, cobaya, mono, o ser humano, dejando tiempo suficiente para que se produzca el metabolismo (normalmente de aproximadamente 30 segundos a 30 horas) y aislando sus productos metabolizados del procesamiento de la orina, sangre u otras muestras biológicas. Las estructuras del metabolito se determinan por los métodos de espectrometría de masas de la invención.

FARMACOCINÉTICA

El control de los niveles circulantes de una terapéutica para las determinaciones farmacocinéticas (FC) en un mamífero, incluyendo la semivida, el aclaramiento, el área bajo la curva (AUC) y el volumen de distribución, es necesario para establecer los límites de seguridad / toxicidad y el régimen de dosificación apropiado (Welling, P. (1997) Pharmacokinetics Processes, Mathematics, and Applications, 2nd Ed., American Chemical Society, Washington, DC). La biodisponibilidad es el grado hasta el cual el compuesto administrado alcanza la circulación general desde la forma de dosis administrada, normalmente expresado como un porcentaje de la dosis administrada. La semivida de un compuesto es el tiempo requerido para que el 50 % de la concentración plasmática máxima del compuesto se elimine por excreción o biotransformación (metabolismo). El índice terapéutico expresa la selectividad del compuesto entre la actividad terapéutica deseada y los efectos secundarios tóxicos no deseados. Las mediciones farmacocinéticas de los métodos de la invención dilucidan la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los anticuerpos y los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC).

Cuando se administra *in vivo*, el conjugado anticuerpo-fármaco puede sufrir hidrólisis, escisión del resto de fármaco, desnaturalización del anticuerpo, glucuronidación, oxidación, u otros acontecimientos de degradación metabólica. Los métodos de espectrometría de masas y captura por afinidad basada en esferas de la invención se desarrollan para caracterizar con exactitud y medir los productos de estos acontecimientos.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I, y, opcionalmente, un anticuerpo de Fórmula I donde p es 0, o fragmentos de anticuerpo o metabolitos de anticuerpo del mismo, se administra a, o está en contacto con, una fuente biológica seleccionada de un mamífero, tejido, cultivo de células, plasma o suero. Se sabe que el análisis de las muestras de suero y plasma es problemático debido a su alto fondo proteómico, es decir, muchas proteínas y otros analitos. Después de un cierto período de tiempo, que va desde minutos, horas, días, se recoge una muestra biológica que comprende el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I, o fragmento o metabolito del mismo. La muestra biológica puede recogerse por cualquier medio, incluyendo la extracción de un fluido mediante una jeringuilla o cánula. La muestra biológica puede ser sangre o productos sanguíneos tales como suero, plasma o similar, líquido cefalorraquídeo u otro fluido corporal, por ejemplo, saliva, orina, linfa, bilis, heces, sudor, o aliento.

Las muestras biológicas se procesan para formar muestras de análisis por procedimientos convencionales que incluyen: formulación, inmovilización, centrifugación, aislamiento, digestión, inducción o prevención de la coagulación de las células sanguíneas, hidrólisis o purificación.

El procesamiento de muestras biológicas sirve para eliminar las impurezas y reducir la heterogeneidad de la muestra que puede dificultar la separación de los constituyentes de la muestra o impedir la recolección de datos o el análisis. Como alternativa, o además de, el procesamiento simplifica la manipulación de la muestra, conserva de la degradación, minimiza el volumen de muestra, o selecciona los constituyentes de la muestra (analitos) de interés en el análisis de espectrometría de masas. Como alternativa, o además de, el procesamiento convierte las muestras biológicas en metabolitos, fragmentos, o derivados que son de interés en la determinación del metabolismo del fármaco o los efectos farmacocinéticos.

CAPTURA DE MUESTRAS DE ANÁLISIS PROCESADAS

El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I, y, opcionalmente, un anticuerpo de Fórmula I donde p es 0, o fragmentos de anticuerpo o metabolitos de los mismos se capturan sobre esferas de inmunoafinidad donde las esferas tienen un antígeno inmovilizado específico para el anticuerpo o el fármaco del ADC. Un antígeno específico para el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco administrado está biotinilado y unido a esferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina a través de una fuerte interacción biotina-estreptavidina ($K_D = 10^{-15}M$). La Figura 1a ilustra una realización a la que se refiere como la captura del DEC. Los anticuerpos (MAb) y los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) se unen al DEC (dominio extracelular) de una proteína DEC biotinilada que está unida a una esfera paramagnética recubierta con estreptavidina en contacto con un imán. La Figura 1b ilustra otra realización de captura del DEC, en el que los anticuerpos (MAb) y los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) se unen al DEC (dominio extracelular) de una proteína DEC que está unida covalentemente a una esfera. La esfera puede estar configurada en un formato de columna o suelta en un pocillo. La Figura 2 ilustra otra realización de la captura del anticuerpo-resto de fármaco, en el que los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) se unen a un anticuerpo monoclonal anti-fármaco biotinilado (MAb anti-fármaco-biotina) que está unido a una esfera paramagnética recubierta con estreptavidina en contacto con un imán.

La esfera de inmunoafinidad puede comprender un monolito de polímero poroso y puede estar configurada en un canal de flujo a través en comunicación fluida con un depósito de recogida. Las esferas pueden estar contenidas en un recipiente de flujo continuo, tal como una columna o un embudo en el que la muestra de la fuente biológica se introduce en un extremo u orificio, y una muestra se eluye en el otro extremo u orificio. Las esferas de inmunoafinidad pueden estar distribuidas en una pluralidad de recipientes de flujo continuo, cada uno en comunicación con un depósito de recogida separada. Los vasos y depósitos pueden estar configurados en un formato de 96 pocillos de microtitulación de 12 x 8 columnas y filas, o un formato de 384 pocillos de microtitulación de 24 x 16 columnas y las filas para los propósitos de la automatización y la reproducibilidad de los resultados.

Las muestras de plasma o suero del mamífero (fuente biológica) que recibieron la composición de conjugado anticuerpo-fármaco se aplican a las esferas mediante pipeteo manual o dispensación robótica automática. Las esferas pueden estar configuradas en un pocillo u otro recipiente o configuradas en una columna, u otro dispositivo de flujo continuo donde se introduce la muestra en un extremo u orificio, y el efluente lavado o la muestra eluida se eluye por el otro extremo u orificio. Se deja que se unan los constituyentes de la muestra específicos para el antígeno de unión a la esfera. Las esferas se lavan para enjuagar las proteínas no específicas y otros constituyentes de la muestra no específicos. Los anticuerpos unidos se pueden desglucosilar sobre las esferas, por ejemplo, con PNGasaF. Los constituyentes de la muestra unidos pueden eluirse en una placa de la muestra, con los vasos o pocillos que reciben segregados. Las muestras eluidas pueden abordarse después mediante pipeta manual o mediante transferencia robótica y se separaron por cromatografía de fase inversa y los constituyentes de la muestra separados se analizan por espectrometría de masas.

La justificación para el uso de esferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina incluye: (i) la fuerte interacción estreptavidina-biotina ($K_D = 10^{-15}M$), (ii) el analito inmovilizado con estreptavidina / biotinilado es un método probado, (iii) la alta capacidad de unión (material suficiente para proteínas intactas), (iv) unión inespecífica baja (v) la elución

de la muestra con disolventes compatibles con espectrometría de masas, (vi) la buena recuperación de la muestra de las esferas, y (vii) la facilidad de uso y posibilidad de automatización.

5 La muestra biológica puede digerirse con digestión con tripsina. Para la digestión con tripsina, las muestras pueden reducirse con DTT, S-carboximetilarse con yodoacetato de sodio, y después digerirse con tripsina. Las muestras digeridas se pueden analizar mediante: (i) HPLC de fase inversa, por ejemplo, columna Nucleosil C18; (ii) cromatografía de exclusión por tamaño (CET), por ejemplo, columna TSK 3000SWxL; o (iii) cromatografía de afinidad con boronato usando una columna de TSK Boronate.

10 SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA MUESTRA

15 Para formar la muestra de análisis, la muestra biológica puede aplicarse a un medio de separación para efectuar la separación de más de un constituyente de la muestra. Los métodos de separación incluyen los métodos de afinidad, cromatografía y electroforesis. Los métodos de afinidad incluyen cromatografía de afinidad, adsorción, y matrices de afinidad inmovilizadas. Los métodos de cromatografía incluyen HPLC, interacción hidrófoba (CIH), intercambio aniónico, intercambio catiónico, de fase inversa, de fase normal, de fase inversa de pares de iones, en capa fina, de flujo capilar, y de exclusión por tamaño. Los métodos electroforéticos incluyen gel unidimensional, gel fino, capilar, poliacrilamida, desnaturalización, solución nativa, libre, papel, de 2 dimensiones, isoelectroenfoco y el voltaje de gradiente. Otros métodos de separación incluyen: diálisis, centrifugación, sedimentación, flotación, precipitación, 20 inmunoprecipitación, y filtración en gel.

25 Los métodos de separación pueden efectuar la separación de los constituyentes de la muestra biológica mediante una o más propiedades físico-químicas, incluyendo, entre otros, tiempo de elución, hidrofobicidad, hidrofiliidad, tiempo de migración, tasa, velocidad, tiempo de retención cromatográfica, solubilidad, volumen o tamaño molecular, carga neta, estado de la carga, carga iónica, punto isoelectrónico, constante de disociación (pKa), afinidad del anticuerpo, movilidad electroforética, potencial de ionización, momento dipolar, capacidad de enlaces de hidrógeno, y movilidad de iones en fase gaseosa.

30 La baja tasa de flujo mediante infusión de flujo capilar en el dispositivo de entrada de espectrometría de masas facilita la sensibilidad de la detección de masas, lo que permite detectar y caracterizar los analitos de concentración más baja y las especies de mayor peso molecular tales como proteínas intactas y conjugados de anticuerpo-fármaco.

35 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE COMPONENTES SEPARADOS DE LA MUESTRA

La preparación de muestras de conjugado anticuerpo-fármaco para el análisis de espectrometría de masas puede llevarse a cabo generalmente de acuerdo con técnicas conocidas. Véase: "Modern Protein Chemistry: Practical Aspects", Howard, G.C. y Brown, W.E., Eds. (2002) CRC Press, Boca Raton, Fl.

40 Los métodos de la invención son adecuados para el análisis de mezclas de anticuerpos derivadas de muestras biológicas, donde los diferentes componentes químicos de la mezcla se aíslan por primera vez, se separan o se separan parcialmente por uno o más procesos, incluyendo cromatografía de afinidad o que hacen que los constituyentes eluyan secuencialmente o en lote, o que se detecten directamente por espectrometría de masas. Varias características estructurales y propiedades de los anticuerpos se pueden aclarar a partir del análisis de 45 espectrometría de masas, incluyendo: fragmentación, desamidación, glicación, la oxidación, información de la secuencia parcial, por ejemplo N-terminal y C-terminales, dímero y estados de agregación. Uno o más constituyentes químicos en la muestra biológica se pueden caracterizar de una manera altamente específica mediante la medición de su masa exacta, ya que el conjugado anticuerpo-fármaco administrado es de secuencia, estructura y peso molecular conocidos.

50 Diversos sistemas de espectrometría de masas capaces de una exactitud de masa alta, alta sensibilidad y alta resolución se conocen en la técnica y pueden emplearse en los métodos divulgados en el presente documento. Los analizadores de masas de dichos espectrómetros de masas incluyen, pero no se limitan a, cuadrupolo (Q), el tiempo de vuelo (TOF), trampa de iones, sector magnético o FT-ICR o combinaciones de los mismos. La fuente de iones del espectrómetro de masas debe producir principalmente iones moleculares de la muestra, o iones pseudomoleculares, y ciertos iones de fragmentos caracterizables. Ejemplos de este tipo de fuentes de iones incluyen fuentes de ionización a presión atmosférica, por ejemplo, ionización por electropulverización (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI) e ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI). ESI y MALDI son los dos métodos más empleados para ionizar proteínas para el análisis de espectrometría de masas. ESI y APCI son las técnicas de fuentes de iones más utilizadas para el análisis de moléculas pequeñas mediante LC/EM 60 (Lee, M. "LC/MS Applications in Drug Development" (2002) J. Wiley & Sons, New York).

65 La ionización por desorción láser de superficie potenciada (SELDI) es un ejemplo de una técnica de ionización basada en la superficie que permite la espectrometría de masas de alto rendimiento (documento US 6020208). Normalmente, la SELDI se utiliza para analizar mezclas complejas de proteínas y otras biomoléculas. La SELDI emplea una superficie químicamente reactiva, tal como un "chip de proteína" para interactuar con los analitos, por

ejemplo, proteínas, en la solución. Tales superficies interaccionan selectivamente con los analitos y los inmoviliza sobre la misma. Por lo tanto, los analitos se pueden purificar parcialmente en el chip y después analizar rápidamente en el espectrómetro de masas. Al proporcionar múltiples restos reactivos en diferentes sitios sobre una superficie de sustrato, el rendimiento puede aumentar.

5 En los sistemas funcionales, el espectrómetro de masas medirá con exactitud la masa de una especie química de interés dentro de 20 ppm de su masa exacta o calculada, y normalmente dentro de 5 ppm o menos de su masa exacta o calculada. Los analizadores de masas disponibles comercialmente analizadores pueden muestrear y registrar todo el espectro de masas de forma simultánea y con una frecuencia que permite adquirir suficientes espectros para una pluralidad de componentes en la mezcla para asegurar que la intensidad de la señal de espectrometría de masas o el área del pico es cuantitativamente representativa. Esto también asegurará que los tiempos de elución observados para todas las masas no se modificarían o distorsionarían mediante el analizador de masas y que ayudaría garantizar que las medidas cuantitativas no se vean comprometidos por la necesidad de medir la abundancia de señales transitorias.

15 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IONIZACIÓN PR ELECTROPULVERIZACIÓN (ESI)

Se logra una mayor sensibilidad con caudales inferiores debido al aumento de la eficiencia de ionización del analito (Gale et al (1993) Rapid Commun. Mass Spectrom. 7:1017). Por lo tanto, al realizar la inyección por electropulverización de un fluido que contiene la muestra a velocidades de flujo en el rango de nanolitros por minuto proporciona una cuantificación precisa después de la calibración adecuada, y una sensibilidad elevada para un analito contenido en el fluido cuando se combina con espectrometría de masas. Se han notificado sistemas y dispositivos, incluyendo una micro-columna consolidada y miniaturizada y una matriz de micro-columna que tiene adsorbentes cromatográficos de afinidad, que ofrecen una alta selectividad y sensibilidad, y el análisis cualitativo preciso como frontal para la EM (documento US 6811689; documento US 6020208; documento US 6579719).

Las masas de compuestos de peso molecular relativamente alto, tales como anticuerpos, pueden detectarse en proporciones entre la masa y la carga (m/z) que se determinan fácilmente mediante la mayoría de los espectrómetros de masas (intervalos típicos m/z de hasta 2000 a 3000). La espectrometría de masas de ionización por electropulverización ESI-MS, en particular, es adecuada para compuestos cargados, polares o básicos y para el análisis de compuestos con múltiples cargas con excelentes límites de detección. De este modo la ESI permite la detección y caracterización de biomoléculas grandes, tales como anticuerpos y conjugados de anticuerpo-fármaco con un peso molecular (PM) de 150.000 o superior. Con iones de masa alta, se observa normalmente una serie de iones moleculares de carga múltiple. El peso molecular de los iones positivos se determina multiplicando la proporción de m/z medida con el número de cargos (n) menos la masa del catión (C^+) por el número de cargas (n) en dicho ion.

El método ESI permite controlar la presencia o ausencia de fragmentación mediante el control de los potenciales de lentes de interfaz. La ionización por electropulverización (ESI) es compatible con los métodos de separación de líquidos (frontal), así como los métodos de detección de espectrometría de masas (trasero) ("espectrometría de masas de ionización por electropulverización: Fundamentals, Instrumentation, and Applications", Cole, R.B., Ed. (1997) Wiley, New York).

Los datos de ESI-MS pueden adquirirse mediante la realización del promedio de una serie de exploraciones y suavizar los datos para proporcionar un buen pico de intensidad y forma. Para los compuestos de baja masa, los picos más abundantes observados son a menudo los iones $[M + H]^+$ en el modo de ion positivo y $[MH]^-$ en el modo de ion negativo. También se pueden observar iones con carga doble y triple, así como dímeros. Los iones positivos con carga doble serán observados en una masa $(PM + 2C^+) \div 2$, donde PM es el peso molecular y C^+ es el catión ionizante, tal como H^+ , Na^+ , o NH_4^+ . A excepción de los compuestos de muy baja masa, los iones detectados tendrán múltiples cargas. Debido a las suaves condiciones (bajo potencial de ionización) de ESI, por lo general se observan solo iones moleculares. Los espectros de ESI pueden tener varios picos de iones moleculares que difieren en la relación masa a carga debido a varios números de cargas que el ion posee.

Una solución diluida de una muestra, por ejemplo, ADC u otra biomolécula puede ser bombeada lentamente a través de una aguja hipodérmica para el análisis ESI-MS. La muestra se puede introducir a través de inyección de flujo o CL/EM. Los caudales típicos oscilan entre menos de 1 microlitro (l) por minuto hasta aproximadamente un mililitro (ml) por minuto. ESI es particularmente adecuado para moléculas biológicas grandes que son difíciles de vaporizar o ionizar. La aguja se mantiene a una alta tensión y el fuerte campo eléctrico en el extremo de la aguja carga la solución nebulizada y crea gotitas cargadas. Las gotitas cargadas evaporan agua para producir, en última instancia, iones moleculares que viajan en la cámara de vacío a través de un pequeño orificio. Durante el proceso de evaporación del disolvente, el complejo unido no covalentemente se transfiere desde la solución a la fase de gas. (Hu et al (1994)). Normalmente se requieren condiciones desolvatación suaves para mantener el complejo en fase gaseosa intacta. El orificio puede calentarse para garantizar que los iones están completamente desolvatados. Algunos sistemas de EM pueden emplear un gas calentado contra-fluido. Las gotitas cargadas se emiten desde una aguja hipodérmica y encogen a medida que evaporan el disolvente antes de entrar en una cámara de vacío. Se pueden usar flujos de calor y gas para ayudar a la desolvatación La cantidad de muestra requerida para las

mediciones de ESI puede reducirse mediante la reducción del flujo de fluido mediante el uso de emisor de electropulverización capilar, puntas, un proceso conocido como nanoelectropulverización. Los métodos de nanoelectropulverización pueden producir una señal constante durante aproximadamente 10-30 minutos para una muestra de 1 μ l. Se ha demostrado que el flujo bajo aumenta la eficiencia iónica y reduce la supresión de iones. Los métodos de nanoelectropulverización se utilizan con frecuencia para los estudios de proteínas EM / EM (Korner et al (1996) J. Am. Soc. Mass Spectrom. 7:150 - 156; Mann, M. and Wilm, M. (1996) Anal. Chem. C8:1 - 8.

El ESI de proteínas produce iones de múltiples cargas con el número de cargas que tienden a aumentar a medida que aumenta el peso molecular. El número de cargos en una especie iónica dada puede determinarse por métodos tales como: (i) comparar dos estados de carga que se diferencian por una carga y resolver ecuaciones simultáneas; (ii) buscar especies que tienen la misma carga pero diferentes masas de aductos; y (iii) examinar de las relaciones de masa-carga para los grupos isotópicos resueltos. Los métodos de ESI y ESI-MS y los parámetros necesarios para llevar a cabo estos métodos son bien conocidos en la técnica. La delicadeza del proceso de ionización por electropulverización permite que los conjugados de anticuerpos intactos se detecten directamente por espectrometría de masas.

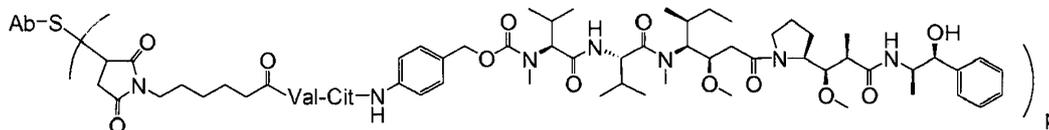
En un ejemplo, un espectro de masas Q1 de la proteína, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo (grandes moléculas) se ejecuta como parte del método. Se puede obtener un espectro de masas Q1 de calidad adecuada de una molécula grande. Dado que existe un potencial para que la cubierta de la proteína cambie, todos los disolventes utilizados para la cromatografía están recién hechos y el ácido se añade al disolvente de elución para posicionar la cubierta del espectro en el intervalo observado. Para las proteínas de ≥ 100.000 unidades de masa, un ácido tal como ácido fórmico puede usarse en aproximadamente 0,1% (volumen) en los disolventes de elución, por ejemplo, tanto un disolvente A (agua) como el B (acetonitrilo). Se puede usar un ácido fuerte, tal como ácido trifluoroacético (TFA), TFA al 0,05 % (volumen) para las proteínas con ≤ 100.000 unidades de masa. Dado que se reduce la cantidad de ácido fórmico, el anticuerpo glicosilado intacto, trastuzumab, capta más carga, cambiando la cubierta más a la izquierda y en el intervalo observado de m/z (1800-3000 m/z). Dado que el potencial (DP) de desagrupamiento aumenta de 30-120V a aproximadamente 70-190V, la carga en el anticuerpo aumenta aún más. Así, la tensión aplicada, la composición del disolvente y los agentes de emparejamiento de iones son factores a tener en cuenta y ajustar. El potencial de la desagrupamiento (PD) puede incrementarse (en rampa) para adquirir una resolución suficiente para seleccionar la mejor gama de iones de carga. Se puede obtener linealidad se puede obtener en una amplia gama de m/z . La desglicosilación del anticuerpo ayuda a cuantificar el anticuerpo intactos o la cadena pesada, fragmentos de ADC. La glicosilación contribuye a una menor eficiencia de ionización y a una sensibilidad, por lo tanto, reducida. Cuando la cuantificación de anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugados, la desglicosilación del anticuerpo puede reducir la heterogeneidad del espectro de masas, aumentar la sensibilidad y simplificar de este modo el análisis.

Se usan tablas de desconvolución para determinar la relación exacta entre la masa y la carga (m/z) para cada especie para su cuantificación. Las aplicaciones de software Deconvolution tal como Analista™ QS (Applied Biosystems, Foster City, CA) están disponibles y / o provistos de espectrómetros de masas comercialmente. El software de desconvolución generalmente proporciona al usuario una tabla de masas desconvolucionadas así como una subtabla de iones m/z utilizados para calcular estas masas

Ejemplos

Ejemplo 1 Análisis de compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco anti-MUC16 en plasma y suero

Un conjugado anticuerpo-fármaco anti-MUC16, 3A5-MC-vc-PAB-MMAE, "Anti-MUC16 ADC" que tiene la estructura:



donde p (DAR) es 1, 2, 3, o 4, Val es valina, Cit es citrulina, y Ab es una cisteína modificada por ingeniería, la variante mutante de la cadena pesada A118C de 3A5, un anticuerpo monoclonal anti-MUC16, se analizó en muestras de plasma y de suero. La variante del anticuerpo 3A5 reconoce epítomos en el dominio extracelular (DEC) de MUC16, una proteína transmembrana de la superficie celular que se sobreexpresa en los cánceres ováricos epiteliales humanas (COE) en comparación con los tejidos humanos normales, y se internaliza tras la unión a MUC16 y pasa a los lisosomas, permitiendo así la liberación dirigida del resto de fármaco auristatina MMAE en las células tumorales positivas para MUC16 (documento WO 2007/001851; documento de EE.UU. N° de serie 60/916657, fecha de presentación 8 de mayo de 2007 CYSTEINE ENGINEERED ANTI-MUC16 ANTIBODIES AND ANTIBODY DRUG CONJUGATES"). El A118C (numeración de la UE) mutante se seleccionó por su reactividad de tior optimizado con reactivos de fármaco-enlazador de acuerdo con el documento US 2007/0092940.

El ADC anti-MUC 16 (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) se caracterizó mediante los siguientes métodos de espectrometría de masas y captura de inmunoafinidad por esferas para medir las cantidades relativas de los constituyentes de la muestra de ADC con diferentes relaciones fármaco-anticuerpos (DAR) en plasma o suero. El método identificó con éxito los constituyentes de la muestra de ADC esperados en el intervalo de concentración analizado (1,25 a 50 µg/ml en un volumen de muestra de 50 µl), lo que indica que no había pérdidas selectivas durante la caracterización EM con captura por afinidad. No se observaron efectos significativos de la matriz a través de plasma o suero de diferentes especies. Los resultados del plasma de rata, mono cynomolgus y ser humano fueron comparables con los obtenidos a partir de mezclas de ADC enriquecidas contra-MUC16 en tampón de PBS con BSA al 5 %. También se obtuvieron resultados comparables a partir de muestras de plasma y suero en las matrices de rata, mono cynomolgus. Se estableció una matriz de estabilidad de congelación/descongelación a corto para las mezclas de anti-MUC16 ADC (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) tanto en plasma de rata (hasta 3 ciclos) como en suero de cynomolgus (hasta 6 ciclos). Las muestras procesadas se mantuvieron en un muestreador automático fijado para mantener 2 °C - 8 °C durante aproximadamente 13 horas.

El rendimiento del ensayo del método de esferas de inmunoafinidad / EM se caracterizó para la medición de las cantidades relativas de mezclas de ADC anti-MUC16 con diferentes valores de carga del fármaco, $p = 0$ (anticuerpo desnudo), 1 (un fármaco por anticuerpo), y 2 (dos fármacos por anticuerpos), en plasma o suero. Los patrones del anticuerpo desnudo ($p = 0$) y ADC ($p = 1$ y 2) se combinaron para obtener mezclas de composición conocida. Las mezclas estándar se enriquecieron en el plasma (rata, mono cynomolgus y ser humano) y suero (por ejemplo, la rata y el mono cynomolgus) y se recuperaron por captura de afinidad con DEC rhu MUC16 biotinilado inmovilizado sobre esferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Los constituyentes de ADC de anti-MUC16 capturados se lavaron, se desglucosilaron y se eluyeron de las esferas y se analizaron por CL de flujo capilar acoplada a detección de espectrometría de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo. Se seleccionó una ventana de tiempo representativa del cromatograma de iones totales (CIT) que contiene las señales de los constituyentes contra-MUC16 ADC para obtener el espectro de masas extraído. Tras la desconvolución del espectro de masas, se utilizaron las áreas de los picos para los constituyentes anti-MUC16 ADC con $p = 0, 1, o 2$ para calcular las cantidades relativas de anti-MUC16 ADC con diferente carga de fármaco (p) en plasma o suero.

El DEC MUC 16 humano biotinilado se inmovilizó sobre esferas recubiertas con estreptavidina y se utiliza para capturar Anti-MUC16 ADC mediante la incubación con las muestras de plasma o suero del estudio a temperatura ambiente. Por ejemplo, las esferas pueden ser esferas de SEPHAROSE® de aproximadamente 10-100 micrómetros de diámetro. Si las esferas son paramagnéticas, después de la unión de los constituyentes de la muestra, las esferas paramagnéticas se mantienen en su lugar por el imán, lo que permite la segregación, el aislamiento y el lavado de los constituyentes de la muestra unidos a las esferas. Si las esferas no son paramagnéticas, las esferas pueden configurarse en una columna con una entrada y salida para el flujo de la fase móvil. Los constituyentes de la muestra se pueden eluir como la muestra de análisis procesada con un medio de elución o tampón, por ejemplo, con concentraciones elevadas de ácido y sustancias orgánicas, y la muestra eluida se puede recoger para su aplicación a los medios de separación para efectuar la separación de los constituyentes de la muestra, seguido de espectrometría de masas. El tampón de lavado no específico típico es acuoso y puede incluir acetato de sodio y cloruro de sodio a un pH de aproximadamente 7,4. El tampón de elución de la muestra de anticuerpos típico es acuoso y puede contener un alcohol de bajo peso molecular tal como isopropanol, acetonitrilo, u otro disolvente orgánico, y un ácido tal como ácido fórmico, a un pH de 2-4. Después de la elución, las esferas de DEC inmovilizadas se pueden recoger, reutilizar o eliminar.

Alternativamente, las esferas de SEPHAROSE® pueden portar una funcionalidad amino-reactiva tal como éster de NHS (N-hidroxisuccinimida) que puede reaccionar (acoplarse a) con la proteína DEC. Los grupos amino reactivos de la proteína DEC, tales como cadenas laterales de lisina, desplazan el grupo NHS, de modo que forman un enlace amida estable entre el DEC y la esfera. Un tampón de acoplamiento típico es acuoso y puede incluir sales seleccionadas de fosfato, bicarbonato de sodio y cloruro de sodio en o cerca de pH neutro, por ejemplo, pH 7-9. El excedente de la funcionalidad reactiva no acoplada se puede tapar con una amina reactiva de bajo peso molecular, tal como etanolamina en medio acuoso y puede incluir sales seleccionadas de bicarbonato de sodio y cloruro de sodio en o cerca de pH neutro, por ejemplo, pH 7-9.

Las esferas se pueden configurar en un formato de columna, con una entrada y salida para las soluciones de elución de lavado. Una realización comercialmente disponible de esferas de SEPHAROSE® activadas con NHS incluye una columna de afinidad de 1,0 ml HiTrap NHS HP (Amersham).

Tras la captura por afinidad, el anti-MUC16 ADC unido (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) se aisló y se desglucosiló. Esta última etapa se utilizó para reducir la heterogeneidad de la muestra y simplificar los espectros de masas. Después de varios lavados para eliminar las proteínas del plasma unidas no específicamente, los constituyentes de la muestra de ADC Anti-MUC16 se eluyeron con el agua que contiene 30 % de acetonitrilo y 1 % de ácido fórmico y se inyectaron en un sistema de CL capilar de fase inversa. Los constituyentes de la muestra (analitos) se ionizaron mediante pulverización iónica turbo y se detectaron mediante espectrómetro de masas cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-Star XL operado en el modo TOF-MS positivo. Una ventana de tiempo representativa del cromatograma de iones totales (TIC) se seleccionó para obtener el espectro de masas. El espectro de masas se desconvolució y las áreas de los picos se obtuvieron para cada constituyente de la muestra de Anti-MUC 16 ADC de interés. Se

calcularon las proporciones relativas del constituyente de la muestra anti-MUC16 ADC p = 0, 1, y 2.

Se evaluaron los siguientes parámetros del ensayo.

5 Eficiencia de ionización: Patrones de referencia anti-MUC16 ADC (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) con p = 0, 1, y 2 específica (DAR-0, DAR-1 y DAR-2, respectivamente) se mezclaron en diferentes proporciones (por ejemplo, 33:33:33 y 30:60:10). Después, la mezcla se incubó a 37 °C durante la noche para desglucosilación. La mezcla desglucosilada se diluyó hasta aproximadamente 30 µg/ml y se inyectó una alícuota de 10 µl directamente en la CL/EM para el análisis.

10 Se obtuvo el cromatograma de iones totales de los constituyentes de la muestra ADC anti-MUC16 (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) con p = 0, 1, y 2 (DAR-0, DAR-1 y DAR-2) en una proporción de 30: 60:10 en HBS-EP y se seleccionó una ventana de tiempo representativa que contiene las señales del ADC. Las ventanas de tiempo pueden cambiar debido a variaciones en las condiciones de CL. El espectro de masas correspondiente se extrajo y se mostró la característica cubierta de la carga para los constituyentes de la muestra ADC. La desconvolución del espectro de masas generó una tabla del área del pico con el correspondiente espectro de masas desconvolucionado. Sobre la base de las masas moleculares de los constituyentes de la muestra anti-MUC16 ADC se identificaron tres picos principales como DAR-0, DAR-1 y DAR-2 a aproximadamente 144.834 Da, 146.033 Da y 147.223 Da, respectivamente. Sin calibración interna, la exactitud de la masa del instrumento fue de aproximadamente ± 50 Da. Otros picos menores se debían en gran parte al fondo de la matriz, aductos, y / o heterogeneidad de los materiales de referencia. No dieron lugar a ningún impacto significativo para el cálculo de las cantidades relativas de los constituyentes de la muestra ADC y, por lo tanto, no se usaron en los cálculos de relación posteriores. Las tres áreas de los picos individuales se sumaron como el área total del pico y se calculó la relación porcentual relativa de cada constituyente de la muestra de anti-MUC16 ADC. Los datos se resumen en la Tabla 1A y 1B (más adelante) para las dos mezclas enriquecidas, respectivamente. Se analizaron tres repeticiones para cada composición enriquecida. Claramente, la exactitud media estaba en el intervalo de 70 % a 130 %. Por consiguiente, se llegó a la conclusión de que los constituyentes de la muestra de el anti-MUC16 ADC con DAR-0, DAR-1 y DAR-2 no demostraron ninguna diferencia significativa en su eficiencia de ionización en el modo de pulverización iónica turbo en modo positivo.

30 Tabla 1. Proporciones relativas de los constituyentes de la muestra de anti-MUC 16 ADC (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) en tampón HBS-EP medidas directamente mediante CL/EM para las mezclas conocidas de DAR 0, DAR 1 y DAR 2

A:				B:			
Enriquecido (%)	Medido (%)			Enriquecido (%)	Medido (%)		
DAR0/DAR1/DAR2	DAR 0	DAR 1	DAR 2	DAR0/DAR1/DAR2	DAR 0	DAR 1	DAR 2
33/33/33	30	38	32	30/60/10	31	61	8
	31	36	33		31	60	9
	31	37	32		31	61	8
Media	31	37	32	Media	31	61	8
SD	0,4	0,8	0,6	SD	0,1	0,5	0,6
RSD (%)	1,1	2,3	1,7	RSD (%)	0,4	0,8	7,4
Exactitud (%)	93	110	97	Exactitud (%)	103	101	82

35 Selectividad: Para confirmar que no había pérdidas selectivas durante la captura por afinidad de los componentes DMUC4064A con rhuMUC16 ECD, patrones de DMUC4064A conocidos con diferentes DAR se enriquecieron a varias concentraciones en plasma de rata y se analizaron mediante EM de afinidad. La Tabla 2 muestra las proporciones medidas frente a las proporciones enriquecidas teóricas para DAR-0, DAR-1 y DAR-2 a 10:30:60, 30:60:10 y 33:33:33, respectivamente.

40

Tabla 2 Proporciones medidas frente a las proporciones enriquecidas para los constituyentes de la muestra de anti-MUC 16 ADC (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) en plasma de rata medidas mediante EM de afinidad

Proporción enriquecida (%)	Proporción medida (%)			
	DAR 0/DAR 1/DAR 2	DAR 0	DAR 1	DAR 2
10/30/60		11	31	59
		10	30	60
		11	30	59
Media	11	30	59	
SD	0,9	0,6	0,6	
RSD (%)	8,6	1,9	0,9	
Exactitud media (%)	106	101	99	
30/60/10		28	62	9
		30	61	9
		30	60	10
Media	29	61	10	
SD	0,8	1,0	0,2	
RSD (%)	2,8	1,6	2,1	
Exactitud media (%)	98	102	95	
33/33/33		28	34	38
		28	34	38
		28	34	38
Media	28	34	38	
SD	0,1	0,4	0,3	
RSD (%)	0,5	1,3	0,9	
Exactitud media (%)	84	102	117	

5 La exactitud media estaba en el intervalo de 70 % a 130 % para tres constituyentes de la muestra anti-MUC16 ADC de DAR-0, DAR-1 y DAR-2 en diferentes composiciones, lo que indica que las esferas de DEC de afinidad modificada fueron capaces de recuperar los ADC sin pérdidas selectivas de plasma y con una exactitud demostrada aceptable.

10 Efectos de la matriz en diferentes especies: Los patrones de referencia de anti-MUC16 ADC (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) con p = 0, 1, and 2 específica se enriquecieron a una proporción de 30:60:10 en plasma de rata, mono cynomolgus y ser humano o en tampón PBS con 5 % de BSA. Se utilizó una concentración total DE ADC de 30 µg / ml. Tres repeticiones para cada especie de plasma se recuperaron mediante esferas de afinidad modificadas para el DEC y se compararon con los resultados de tampón de PBS con 5 % de BSA, que se usó como control. El plasma blanco de rata, mono cynomolgus y ser humano tratado mediante captura por afinidad de DEC y los constituyentes de la muestra de anti-MUC16 ADC se analizaron mediante TIC (cromatografía de iones totales). No se encontraron picos de analitos significativos en la ventana de tiempo d ADC típica. Las señales de TOF MS extraídas también eran demasiado bajas para su desconvolución, lo que indica que la captura por afinidad mediante el DEC MUC16 humano era relativamente limpia y se había sometido a impactos mínimos por las proteínas no específicas de las matrices de plasma.

20 Los cromatogramas de TIC representativos para los constituyentes de la muestra de anti-MUC16 ADC introducidos en plasma de rata, mono cynomolgus y ser humano se compararon con los del control de tampón PBS. Los patrones cromatográficos para los constituyentes de la muestra de anti-MUC16 ADC en estas cuatro matrices capturados mediante inmunoafinidad del DEC fueron muy similares. Se observaron patrones de distribución DAR similares obtenidos a partir de la ventana de tiempo de retención cromatográfica representativa entre las tres matrices de plasma de especie y el control PBS (tampón). A los constituyentes de la muestra se les asignó una DAR de 0 (+0, anticuerpo desnudo), DAR-1 (+1D, una unidad enlazadora del fármaco MC-vc-PAB-MMAE) y DAR-2 (+2D, dos unidades enlazadoras del fármaco MC-vc-PAB-MMAE). La comparación detallada de las cantidades relativas de los componentes DAR-0, DAR-1 y el DAR-2 componentes se muestran en la Tabla 3. La desviación típica relativa global (RSD) fue muy inferior al 30 % para las cuatro matrices analizadas. Por tanto, el método de EM de afinidad mostró 30 mínimos efectos de matriz en las diferentes especies. La exactitud global estaba dentro del intervalo de 70 a 130 %.

Tabla 3 Precisión y exactitud para anti-MUC16 ADC (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) enriquecida en varios plasmas en diferentes especies y tampón PBS

DAR 0/DAR 1/DAR 2 (30/60/10)	% DAR 0	% DAR 1	% DAR 2
Plasma de rata	31	57	12
	28	60	12
	29	59	12
Media (plasma de rata) SD (plasma de rata)	30 1,5	59 1,6	12 0,1
Plasma de mono cynomolgus	27	59	13
	29	58	13
	29	58	13
Media (plasma de mono cynomolgus) SD (plasma de mono cynomolgus)	29 1,1	58 0,8	13 0,3
Plasma de humana	29	59	12
	29	60	11
	29	59	12
Media (plasma de ser humano) SD (plasma de ser humano)	29 0,1	59 0,7	12 0,6
PBS con 5 % de BSA	29	59	12
	28	59	12
	27	60	13
Media (PBS) SD (PBS)	28 1,2	60 0,7	12 0,6
Media global (4 matrices, n= 12)	29	59	12
SD global (n= 12)	1,1	1,0	0,7
RSD global (%), n = 12	3,8	1,7	5,5
Exactitud global (%), n = 12	96	98	122

- 5 Efectos de la matriz entre el plasma y el suero: Los patrones de referencia de anti-MUC16 ADC (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) con p = 0, 1, and 2 específica se enriquecieron a una proporción de 30:60:10 en matrices de plasma y de suero de rata y de mono cynomolgus. Se observaron espectros de masas desconvolucionados comparables entre matrices de suero y plasma en cada caso. Los valores obtenidos para las mezclas DMUC4064A de composición conocida con DAR 0, 1 DAR, y DAR 2 en matrices de plasma y suero se muestran en la Tabla 4. La RSD global en matrices de rata estaba dentro del intervalo aceptable de 30 %, lo que indica que no hay sesgo se produjo durante la
- 10 captura por afinidad por el DEC entre el plasma y el suero de rata. Del mismo modo, la RSD global en matrices mono cynomolgus fue <3 0%, lo que muestra ausencia de sesgo entre el plasma y el suero de mono cynomolgus.

Tabla 4 Determinación de la precisión de los constituyentes de la muestra de anti-MUC16 ADC (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) en plasma y suero de rata y mono cynomolgus

Proporción de enriquecido (%) DAR 0/DAR 1/DAR 2 (30/60/10)	Proporción medida (%)		
	DAR 0	DAR 1	DAR 2
Plasma de rata	31	57	12
	28	60	12
	29	59	12
Media SD	30 1,5	59 1,6	12 0,1
Suero de rata	28	58	13
	25	61	14
	28	59	14
Media SD	27 2,1	59 1,8	14 0,3

Media global en rata (n= 6)	28	59	13
SD global en rata (n= 6)	2,2	1,6	1,1
RSD global (%) en rata (n= 6)	7,8	2,7	8,7
Plasma de mono cynomolgus	27	59	13
	29	58	13
	29	58	13
Media	29	58	13
SD	1,1	0,8	0,3
Suero de mono cynomolgus	27	60	13
	30	57	13
	28	60	13
Media	28	59	13
SD	1,5	1,5	0,0
Media global en mono cynomolgus (n= 6)	28	59	13
SD global en mono cynomolgus (n= 6)	1,2	1,2	0,3
RSD global (%) en mono cynomolgus (n= 6)	4,3	2,0	2,3

A fin de evaluar los potenciales efectos de la matriz entre el plasma y el suero, se recogió un subconjunto *in vivo* de muestras de mono cynomolgus a los que se ha administrado anti-MUC16 ADC (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) se y se analizaron usando la captura con esferas de inmunoafinidad y el método de espectrometría de masas. Las muestras de plasma y las correspondientes de suero recogidas entre 5 minutos y 22 días después de la dosis de un solo animal se analizaron y se compararon los resultados (Tabla 5). Los resultados indican que no hubo diferencias significativas en las distribuciones DAR relativas los constituyentes de las muestras anti-MUC16 ADC entre las muestras de plasma de mono cynomolgus y las correspondientes de suero. La Figura 9 muestra el ejemplo de los datos de espectrometría de masas con desconvolución de estabilidad *in vivo* en plasma de monos cynomolgus a los que se ha administrado 38 mg / kg de Tio Hu Anti MUC16 (3A5) HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE. La carga promedio del fármaco fue de 1,6 de MMAE/3A5. Aproximadamente el 30% de los ADC dosificados era una forma de DAR +1 diferente de lo generado por la desconjugación de DAR2. Las muestras de plasma se recogieron a los puntos de tiempo de 5 minutos, 6 horas, 24 horas, 72 horas, 6 días, 8 días, 15 días y 22 días y se capturaron mediante el método de esferas modificadas con DEC por inmunoafinidad. A los constituyentes de la muestra se les asignó una DAR de +0 (anticuerpo desnudo), +1D (un unidad enlazadora del fármaco MC-vc-PAB-MMAE) y +2D (dos unidades enlazadoras del fármaco MC-vc-PAB-MMAE). Los pequeños picos a aproximadamente 149.000 y 150.000 uma son constituyentes de la muestra que han sufrido una desglicosilación incompleta.

Tabla 5 Distribuciones DAR relativas de los constituyentes de la muestra de anti-MUC16 ADC (3A5-MC-vc-PAB-MMAE) en plasma y suero de mono cynomolgus recogido de un estudio toxicológico

TK de mono cynomolgus 06 - 1226 Grupo 5, Animal 100415	Suero de mono cynomolgus			Plasma de mono cynomolgus		
	Composición de ADN calculada (%)			Composición de ADN calculada (%)		
Tiempo	DAR 0	DAR 1	DAR 2	DAR 0	DAR 1	DAR 2
5 min.	0	10	90	0	9	91
6 h	0	21	79	0	20	80
24 h	7	31	62	7	31	62
72 h	14	41	46	15	39	46
6 día	20	44	36	19	44	37
8 día	21	45	34	21	45	34
15 día	31	49	20	30	49	21
22 día	41	44	15	42	45	14

La Figura 6 muestra los datos de espectrometría de masas con desconvolución de estabilidad de muestras de Tio Hu Anti MUC16 (3A5) HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE (100 µg/ml en plasma de rata incubado a 37 °C) recogidas en

los puntos de tiempo 0, 6, 24, 48, y 96 horas después de la captura con esferas por inmunofinidad de DEC. A los constituyentes de la muestra se les asignó una proporción de fármaco/anticuerpo (FAR) de +0 (anticuerpo desnudo), +1D (un unidad enlazadora del fármaco MC-vc-PAB-MMAE) y +2D (dos unidades enlazadoras del fármaco MC-vc-PAB-MMAE). La Figura 7 muestra el cambio de la distribución DAR en el tiempo de los constituyentes de la muestra DAR +0, +1, y +2 en plasma de rata.

La eficiencia de la captura con esferas por inmunofinidad de DEC se comparó con la captura con esferas por inmunofinidad con Mab anti-fármaco de Tio Hu Anti MUC16 (3A5) HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE tras la incubación en plasma de rata. Cuatro clones del anticuerpo monoclonal anti-auristatina diferentes se biotinilaron e inmovilizaron en esferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Figura 2). Estos clones anti-fármacos mostraron una captura ineficiente de ADC cargado con un fármaco (DAR +1).

Ejemplo 2 ECD Protocolo de captura con esferas por inmunofinidad de DEC

Las muestras de suero y plasma de monos cynomolgus a los que se ha administrado el conjugado anticuerpo anti-MUC16 – fármaco, 3A5-MC-vc-PAB-MMAE, se procesaron mediante las siguientes etapas:

1. Determinar la localización de las placas para muestras, controles y blancos (placa de 96 pocillos profundos (2 ml de parte superior cuadrada): Analytical Sales and Service Inc. nº de cat. 59623 - 23, o placa de 96 pocillos (500 µl parte superior redondeada): VWR nº de cat. 47743 - 828). Normalmente, se analizan dos blancos y un control del sistema al comienzo de la carrera, seguido de las muestras, y dos blancos y dos controles del sistema se analizan al final de la carrera. Se pueden analizar blancos adicionales durante la carrera si se desea. Las adiciones a los pocillos descritos a continuación se realizan para los pocillos que se utilizan para una muestra, control o blanco.
2. Pipetear 400 µl del tampón HBS-EP (Biacore nº de cat. BR-1001 - 88) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos profundos de parte superior cuadrada que se usarán para la muestra, control o blanco.
3. Resuspender Dynabeads M-280 recubiertas con estreptavidina (Dynabeads, M280 estreptavidina, 10 mg / ml, Nº de cat. ° 110029, nº de lote G74050, BioVeris) agitando suavemente. Pipetear 100 µ de la mezcla de esferas suspendida en la placa de tampón HBS-EP en cada pocillo en uso. Mezclar mediante el procesador de partículas KingFisher 96 Magnetic (Thermo Electron Corp.) a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 segundos.
4. Transferir las esferas a una nueva placa de 96 pocillos profundos de parte superior cuadrada que contienen 400 µl de tampón HBS-EP y mezclar mediante KingFisher a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 segundos.
5. Pipetear 400 µl de tampón HBS-EP en cada pocillo de blanco, muestra o control de una nueva placa de 96 pocillos profundos de parte superior cuadrada.
6. Pipetear 25 de anti-MUC16-ECD biotinilado (Figura 1a) en cada pocillo de blanco, muestra o control de la placa de tampón HBS-EP.
7. Transferir las esferas a la placa de 96 pocillos profundos que contienen tampón HBS-EP y anti-MUC16-ECD biotinilado y mezclar suavemente durante aproximadamente 20 segundos. Tapar la placa con un sello de aluminio.
8. Colocar la placa en un agitador (fijado a velocidad 7) e incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 120 minutos.
9. Transferir las esferas a una de 96 pocillos profundos de parte superior cuadrada que contiene 400 µl de tampón HBS-EP y lavar dos veces usando el KingFisher.
10. Diluir las muestras de plasma o suero en el intervalo del ensayo utilizando un grupo de plasma o suero negativos.
11. Pipetear 400 µl de tampón HBS-EP en una placa de 96 pocillos profundos de parte superior cuadrada y después añadir 50 µl de cada muestra de plasma o suero diluidos, control o blanco a los pocillos apropiados.
12. Transferir las esferas a la muestra de plasma o suero diluidos usando el KingFisher. Mezclar suavemente durante aproximadamente 20 segundos. Tapar la placa con una cinta selladora de aluminio.
13. Colocar la placa en un agitador (a velocidad 7) e incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 120 minutos.
14. Transferir las esferas a una de 96 pocillos profundos de parte superior cuadrada que contiene 500 µl de tampón HBS-EP y lavar dos veces usando el KingFisher.
15. Preparar tampón HBS-EP-glicanasa mezclando tampón HBS-EP, fosfato 80 mM, y N-glicanasa Glyko (Prozyme glyko N-glicanasa, nº de cat. GKE-5006D) en una proporción de 300 partes: 32 partes: 4 partes respectivamente.
16. Pipetear 336 µl de tampón HBS-EP-glicanasa en cada pocillo de una placa de 96 pocillos profundos de parte superior cuadrada.
17. Transferir las esferas al tampón HBS-EP-glicanasa utilizando el KingFisher. Mezclar suavemente durante aproximadamente 20 segundos. Tapar la placa con una cinta selladora de aluminio.
18. Colocar la placa en un incubado fijado a 37 °C y velocidad de agitación fijada a 300 rpm e incubar durante la noche.
19. Transferir las esferas a una de 96 pocillos profundos de parte superior cuadrada que contiene 500 µl de tampón HBS-EP y lavar dos veces usando el KingFisher.

hasta 96 horas.

5 En la Tabla 6 recogen las cantidades relativas de los constituyentes de la muestra Tio Hu Anti MUC16 (3A5) HC A 118C-MC-vc-PAB-MMAE de las mismas muestras a los puntos de tiempo de 0, 6, 24, 48, 96 horas capturadas mediante esferas de inmutioafinidad del DEC y se analizaron mediante espectrometría de masas. Los resultados de la espectrometría de masas por afinidad y del ELISA indicaron que un anticuerpo anti-auristatina no capturaba eficazmente todos los constituyentes de la muestra Tio Hu Anti MUC16 (3A5) HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE conjugados. Por lo tanto, la EM por afinidad puede utilizarse para ayudar a seleccionar el anticuerpo anti-fármaco más apropiado para desarrollar el ensayo de ELISA conjugado.

10

Tabla 6. Captura con esferas por inmutioafinidad

Captura de los constituyentes de la muestra mediante esferas pr inmutioafinidad del DEC y detección mediante espectrometría de masas				
Tiempo h	% DAR +2	% DAR +1	% DAR +0 (Ab desnudo)	% Conjugado
0	100	0	0	100
6	84	16	0	100
24	48	43	9	91
48	36	49	15	85
96	32	50	18	82

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco que comprende:

5 (i) procesar una muestra biológica recogida de una fuente biológica seleccionada de un mamífero, tejido, cultivo celular, plasma o suero previamente puestos en contacto con un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I:



10 en la que

Ab es un anticuerpo;

D es un resto de fármaco maitansinoide o monometilauristatina;

15 L es un enlazador unido covalentemente al Ab y unido covalentemente a D; y

p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, para formar una muestra de análisis mediante formulación, inmovilización, centrifugación, aislamiento, digestión, inducción o prevención de la coagulación de las células sanguíneas, hidrólisis o purificación para formar una muestra de análisis procesada;

20 (ii) capturar la muestra de análisis procesada sobre esferas de inmunoafinidad que comprenden un antígeno específico para la muestra de análisis procesada, en donde la esfera de inmunoafinidad es una esfera paramagnética recubierta con estreptavidina;

(iii) eluir la muestra de análisis procesada;

25 (iv) aplicar la muestra de análisis eluida a un medio de separación para efectuar la separación de más de una muestra constituyente por cromatografía líquida de flujo capilar en donde un constituyente de la muestra separada comprende un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I, en la que p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y

30 (v) establecer la relación entre la masa y la carga de uno o más constituyentes de la muestra separados que es un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I, en la que p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI).

2. El método de la reivindicación 1 que comprende además repetir las etapas (i) a (v) una o más veces.

35 3. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es sangre y la sangre se procesa para formar plasma o suero.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el antígeno es (i) un dominio extracelular (DEC) de una proteína receptora diana, o (ii) un anticuerpo anti-fármaco.

40 5. El método de la reivindicación 4, en el que el DEC o el anticuerpo anti-fármaco están biotinizados y el DEC biotinizado o el anticuerpo anti-fármaco se unen a esferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina por inmunoafinidad.

45 6. El método de la reivindicación 1, en el que la esfera de inmunoafinidad está configurada en un canal de flujo continuo en comunicación fluida con un depósito de recogida.

7. El método de la reivindicación 6, en el que

50 (i) la esfera de inmunoafinidad está configurada en un recipiente de flujo continuo, en el que la muestra de la fuente biológica es introducida en un extremo o un orificio, y una muestra está eluida en el otro extremo u orificio; o

(ii) la esfera de inmunoafinidad está distribuida en una pluralidad de recipientes de flujo continuo, cada uno en comunicación con un depósito de recogida separada; o

55 (iii) los vasos y los depósitos están configurados en un formato de 96 pocillos de microtitulación de 12 x 8 columnas y filas, o un formato de 384 pocillos de microtitulación de 24 x 16 columnas y filas.

8. El método de la reivindicación 1 que comprende además la etapa de tratar la muestra de análisis con un reactivo de desglucosilación.

60 9. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de separación es un soporte de cromatografía.

10. El método de la reivindicación 11, en el que el soporte de cromatografía es un adsorbente de fase inversa.

65 11. El método de la reivindicación 10, en el que (i) la fase inversa es poliestireno, o un injerto o copolímero de poliestireno, o (ii) un efluente desde el soporte de cromatografía se analiza de forma intermitente mediante espectrometría de masas para establecer la relación entre la masa y la carga de más de uno de los constituyentes

aclarados separados.

12. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo del compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I, o el fragmento de anticuerpo o el metabolito del mismo, se une a un antígeno asociado a tumor o a un receptor de la superficie celular en la fuente biológica.

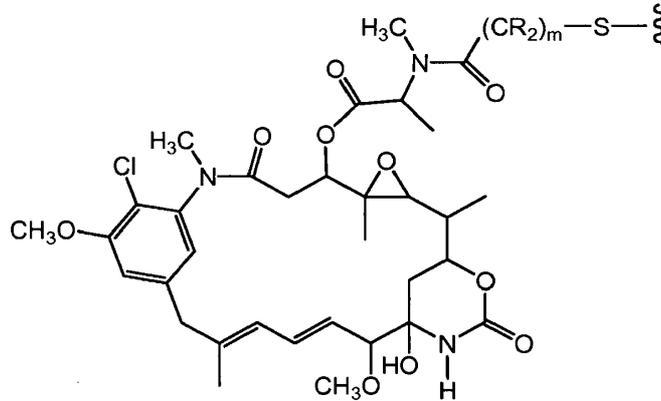
13. El método de la reivindicación 12, en el que el anticuerpo del compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco se une a uno o más antígenos asociados a tumores o a receptores de la superficie celular seleccionados de (1)-(36):

- 10 (1) BMPR1 B (receptor de la proteína morfogenética ósea de tipo IB);
 (2) E16 (LAT1, SLC7A5);
 (3) STEAP1 (seis antígenos epiteliales transmembrana de próstata);
 (4) 0772P (CA125, MUC16);
 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina);
 15 (6) Napi3b (NAPI-3B, NPT1b, SLC34A2, familia 34 de transportadores de soluto (fosfato sódico), transportador 3b de fosfato dependiente de sodio de tipo II, miembro 2);
 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B);
 20 (8) PSCA hlg (genes 2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN ADNc 2700050C12, RIKEN ADNc 2700050C12);
 (9) ETBR (receptor de tipo B de la endotelina);
 (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315);
 (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la
 25 próstata 2, proteína prostática de seis dominios transmembrana);
 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, potencial canal catiónico del receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4);
 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma);
 (14) CD21 (CR2 (receptor 2 del complemento) o C3DR (receptor C3d/del virus de Epstein Barr) o Hs 73792 nº de
 30 acceso en Genbank M26004);
 (15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (beta asociado a inmunoglobulina), B29);
 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C);
 (17) HER2;
 35 (18) NCA;
 (19) MDP;
 (20) IL20Rα;
 (21) Brevican;
 (22) Ephb2R;
 40 (23) ASLG659;
 (24) PSCA;
 (25) GEDA;
 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de células B, receptor BLyS 3, BR3);
 (27) CD22 (receptor de células B, isoforma CD22-B);
 45 (28) CD79a (CD79A, CD79α, alfa asociada con inmunoglobulina);
 (29) CXCR5 (receptor 2 del linfoma de Burkitt);
 (30) HLA-DOB (subunidad beta de la molécula de clase II del MHC (antígeno Ia));
 (31) P2X5 (canal iónico 5 dependiente de ligando P2X del receptor purinérgico);
 (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de las células B, Lyb-2);
 50 (33) LY64 (antígeno linfocitario 64 (RP105));
 (34) FCRH1 (proteína 1 similar al receptor de Fc);
 (35) IRTA2 (receptor de la superfamilia de las inmunoglobulinas 2 asociado a la translocación); y
 (36) TENB2 (proteoglicano putativo transmembrana, relacionado con la familia de EGF/heredulina de factores de
 55 crecimiento y folistatina.

14. El método de la reivindicación 1, en el que L está (i) formado a partir de un reactivo enlazador seleccionado de N-succinimidil-4-(2-piridiltio) propanoato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), o (ii) seleccionado de maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP) y maleimidocaproil-valina-citrulina-para-aminobenciloxycarbonilo (MC-vc-PAB).

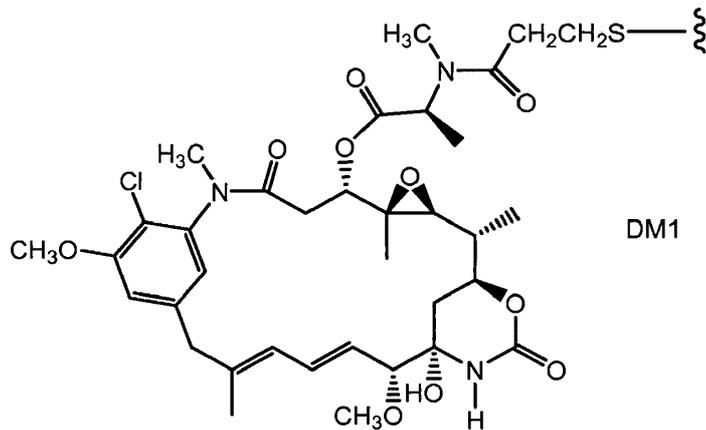
60

15. El método de la reivindicación 1, en el que D es un maitansinoide, que tiene la estructura:



5 en la que la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre de D al enlazador (L) del conjugado anticuerpo-fármaco, R se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, y m es 1, 2 o 3.

16. El método de la reivindicación 15, en el que D es DM1, que tiene la estructura:

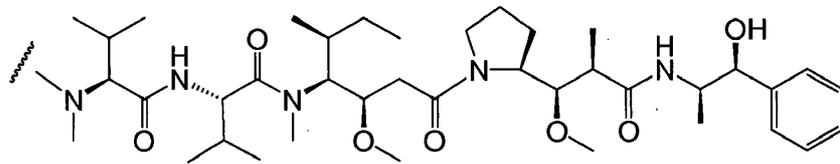


10

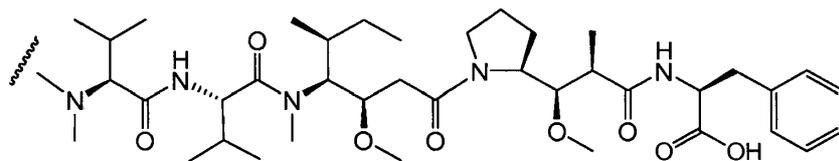
17. El método de la reivindicación 1, en el que D es una monometilauristatina.

18. El método de la reivindicación 17, en el que D es (i) MMAE, que tiene la estructura:

15



o (ii) MMAF, que tiene la estructura:



20

Captura DEC Biotina/Estreptavidina

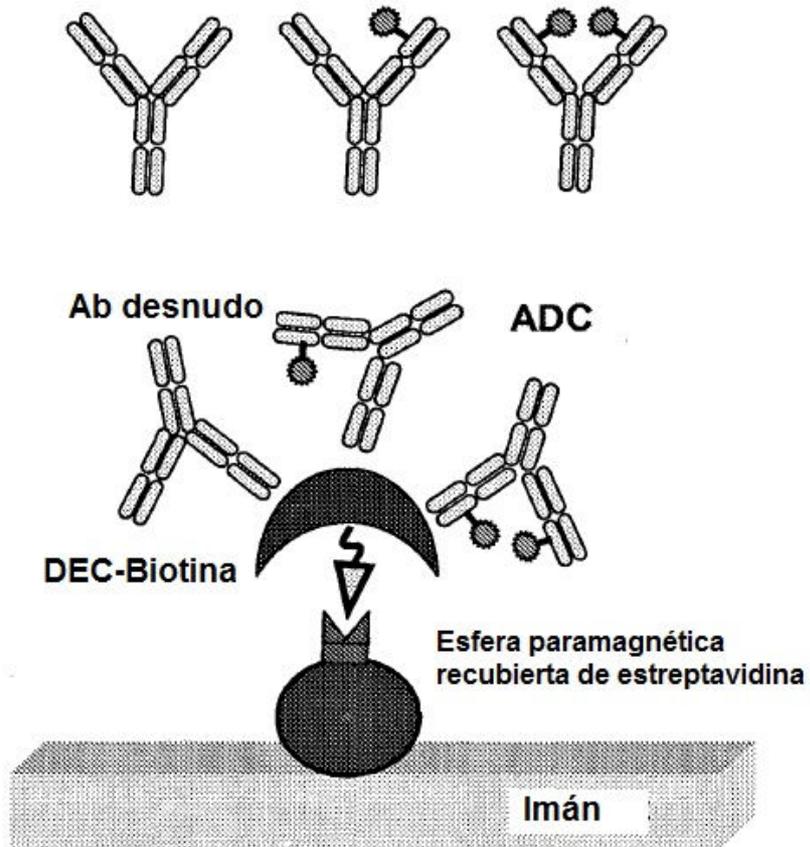


Figura 1a

Captura DEC Esferas unidas covalentemente al DEC

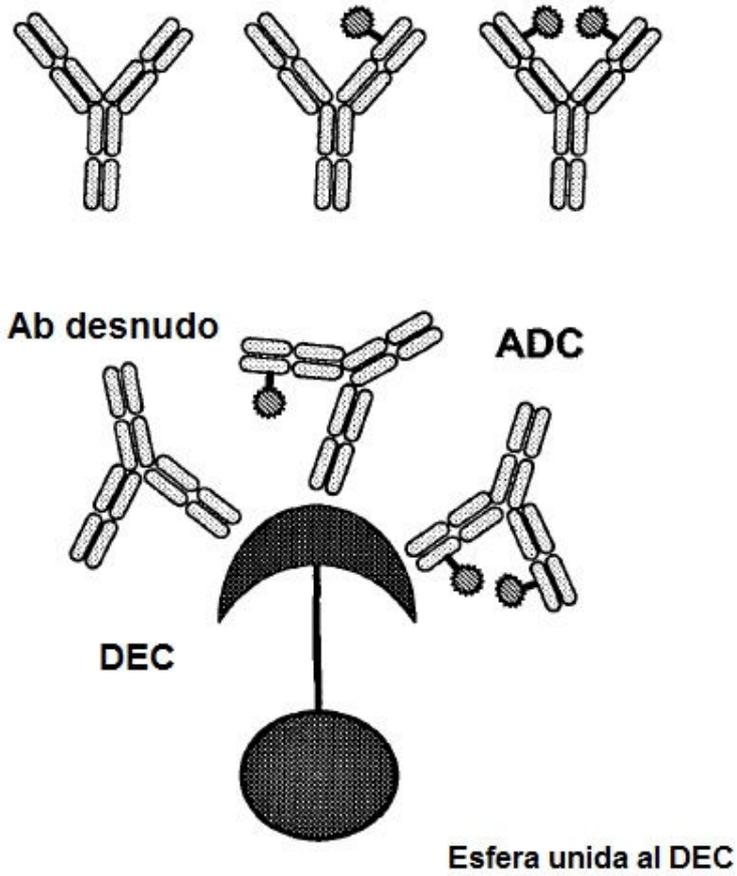


Figura 1b

Captura de MAb anti-fármaco

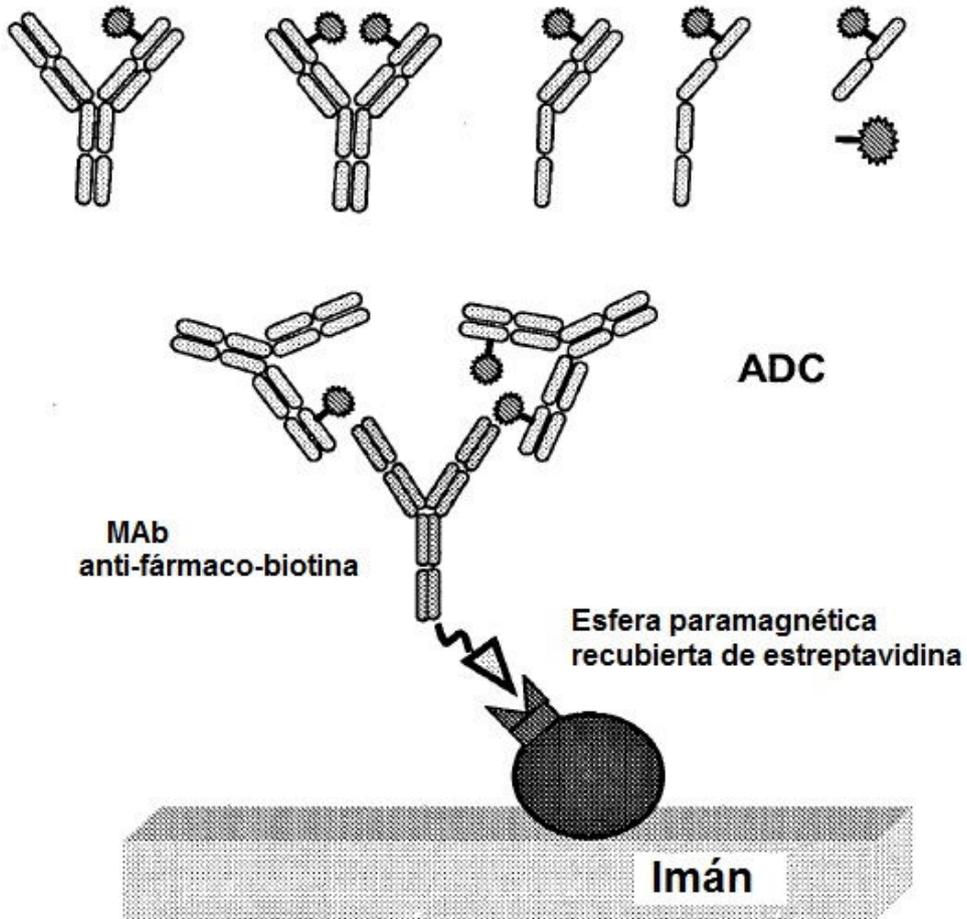
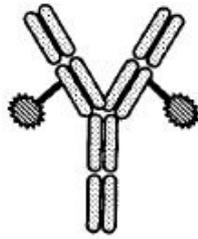
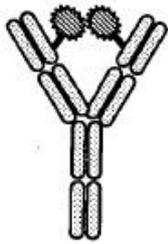


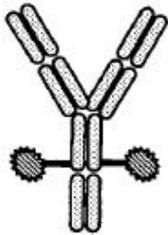
Figura 2



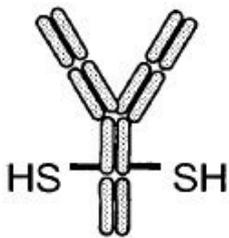
Thio Hu Anti Her2 4D5 LC V205C
-MC-vc-PAB-MMAE (LC)



Thio Hu Anti Her2 4D5 HC A118C
-MC-vc-PAB-MMAE (HC)



Thio Hu Anti Her2 4D5 Fc S400C
-MC-vc-PAB-MMAE (FC)



Thio Hu Anti Her2 4D5 Fc S400C

Figura 3

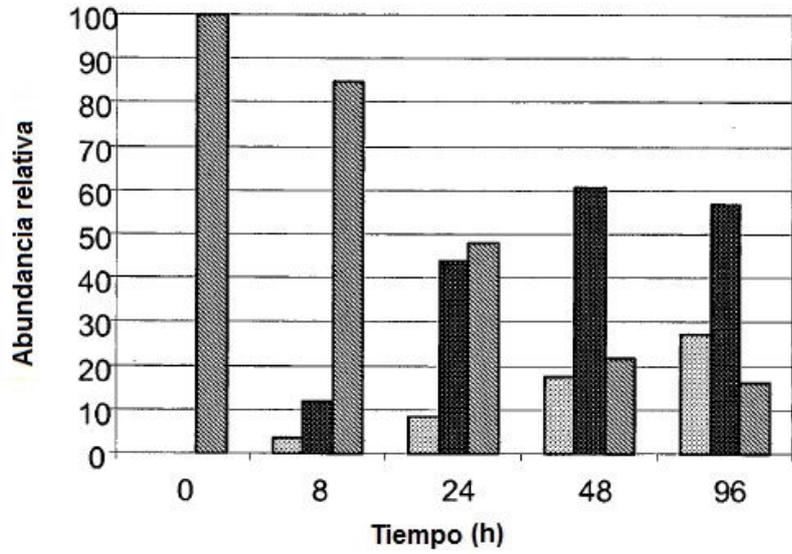
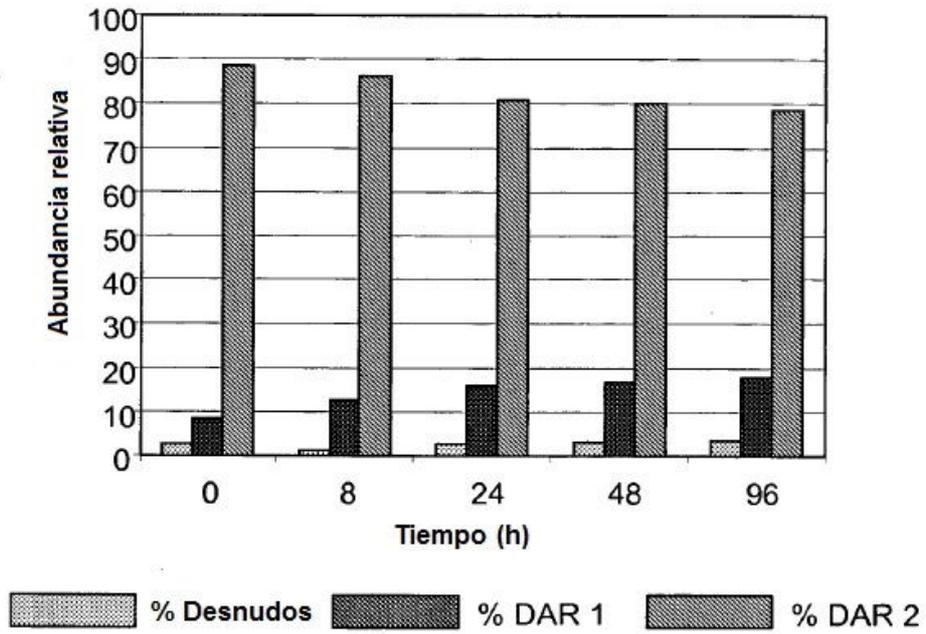


Figura 4

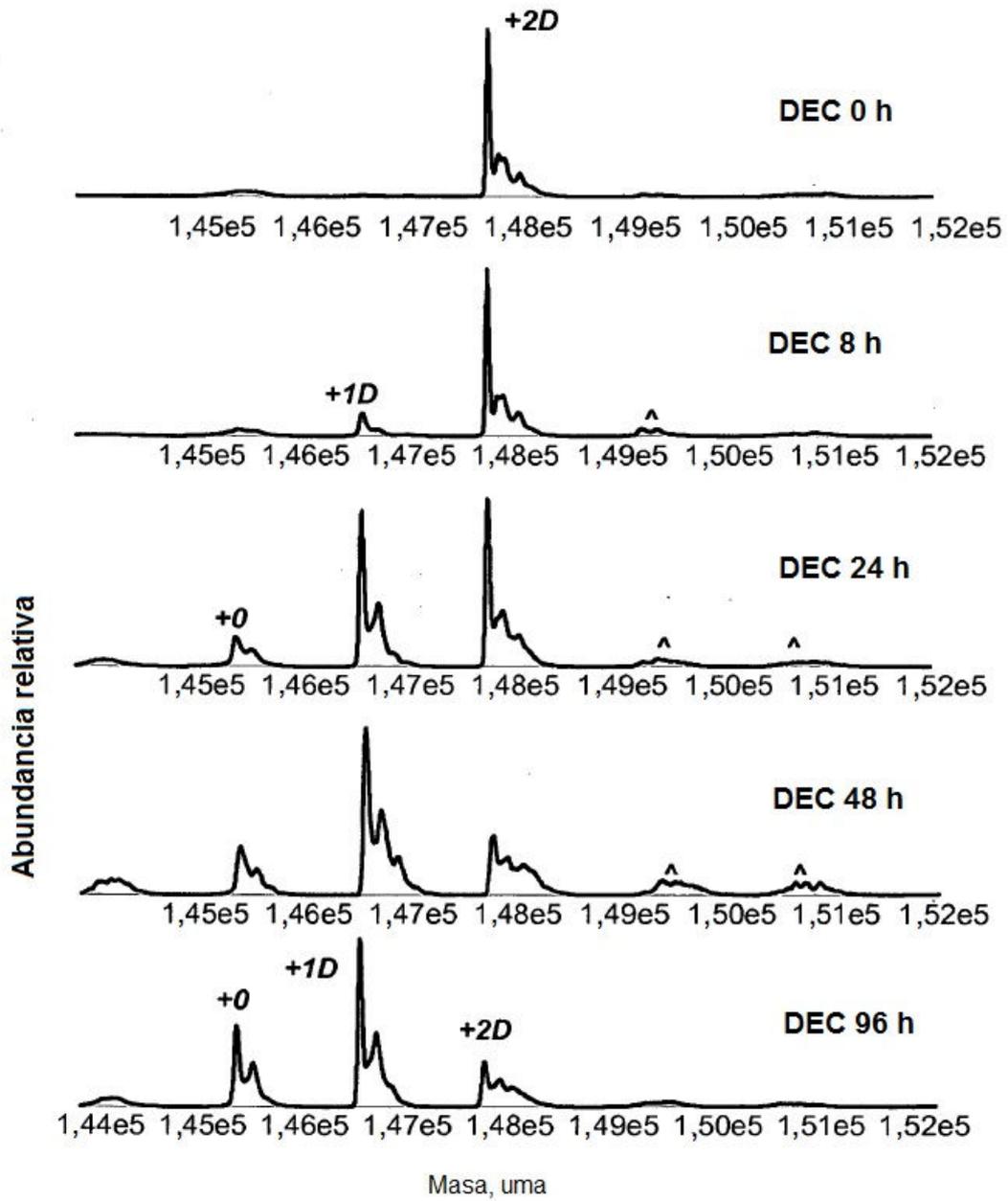


Figura 5

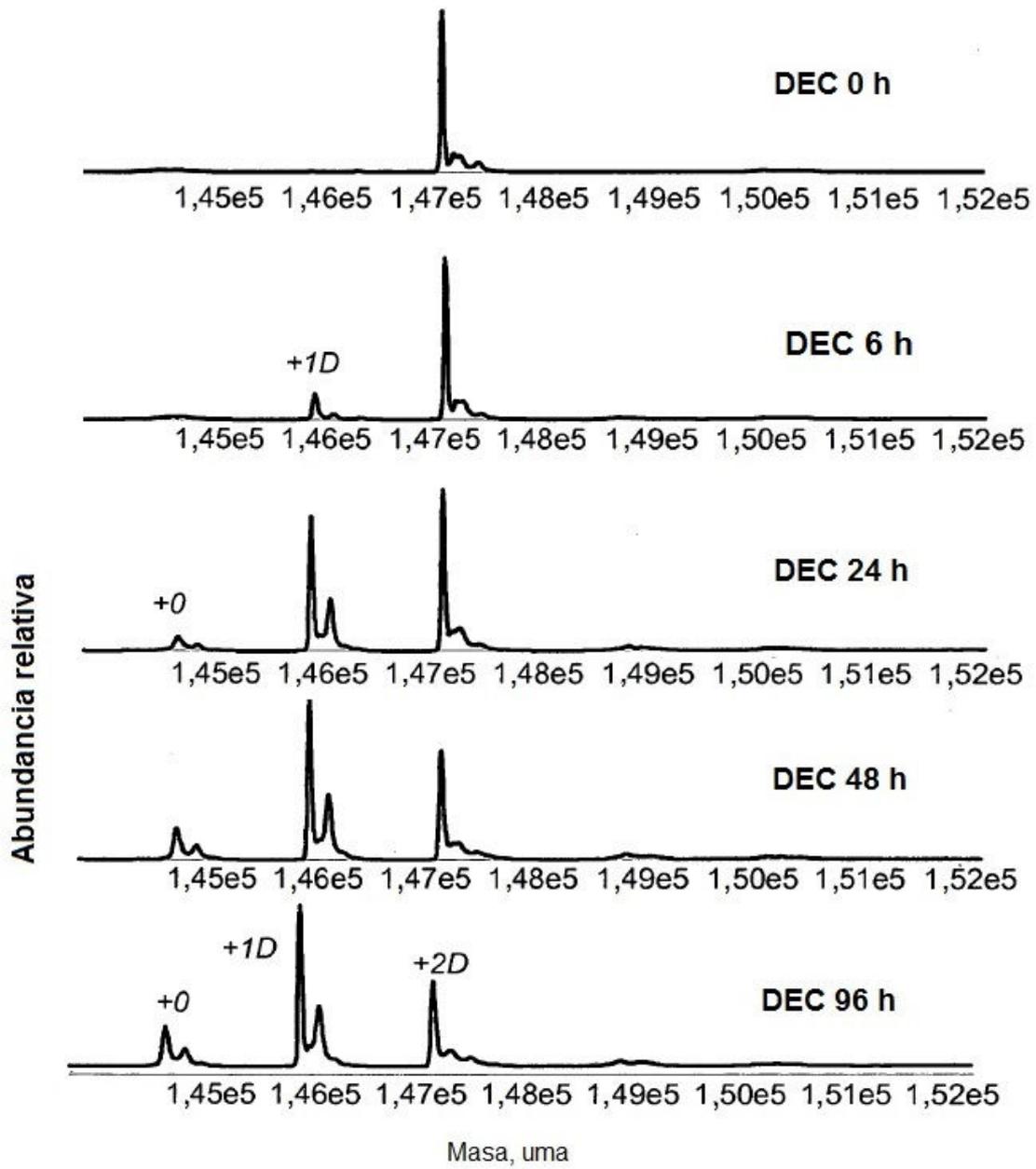


Figura 6

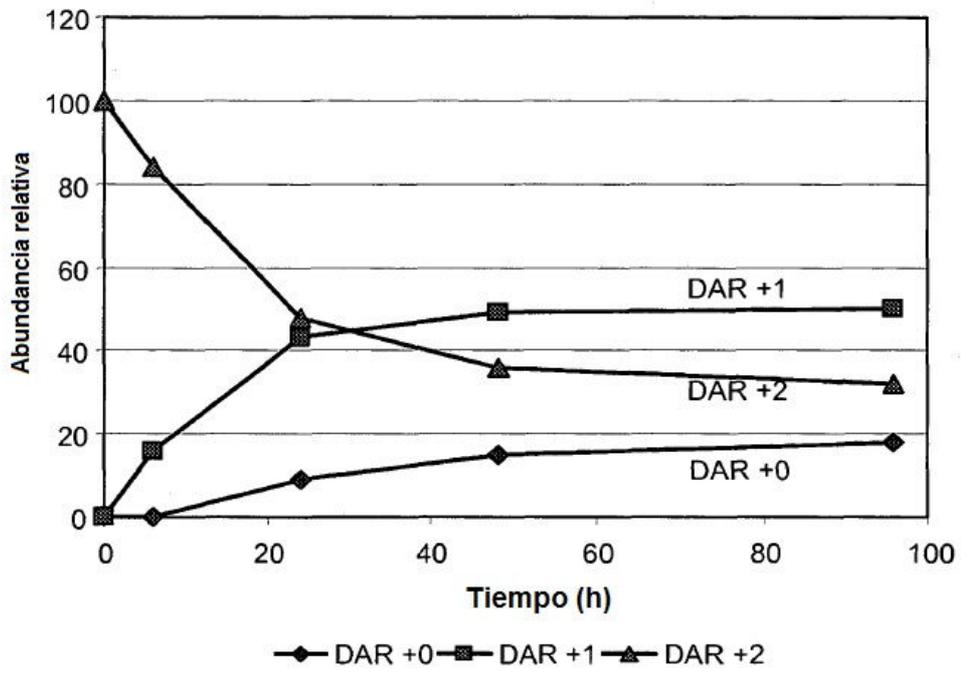


Figura 7

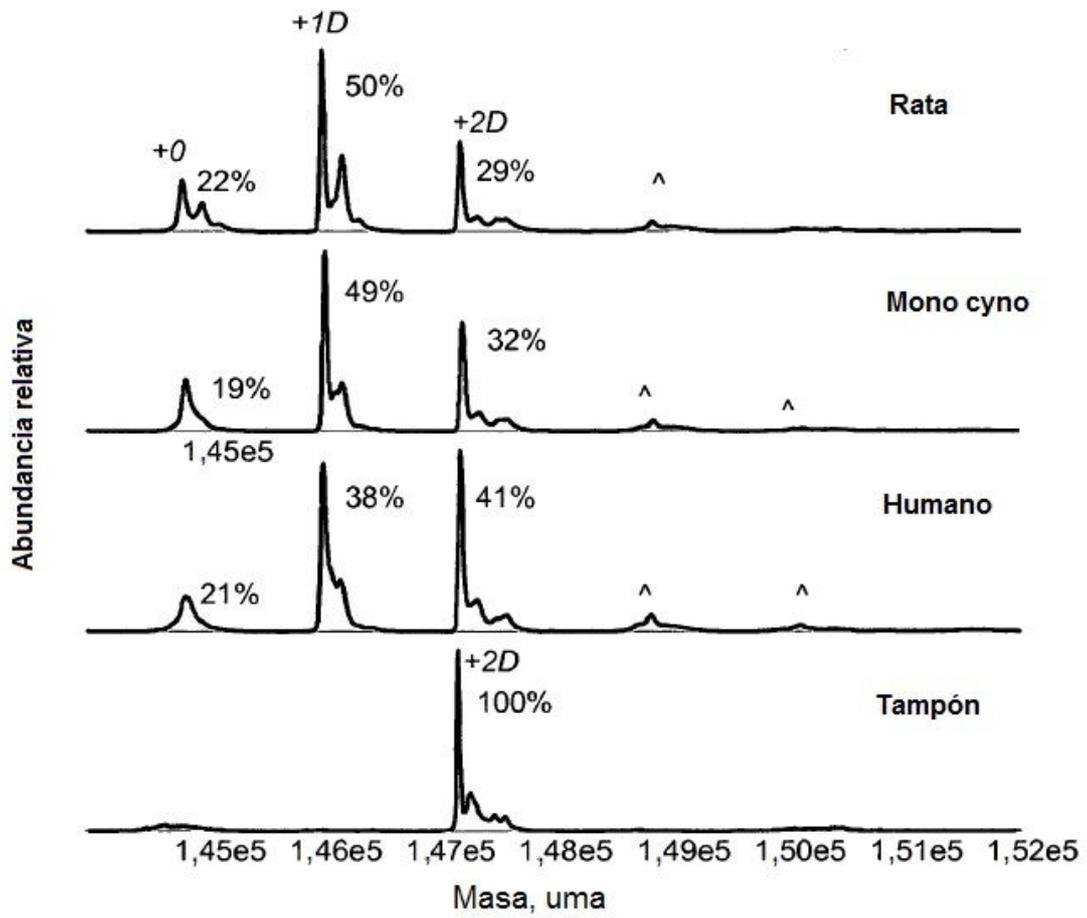


Figura 8

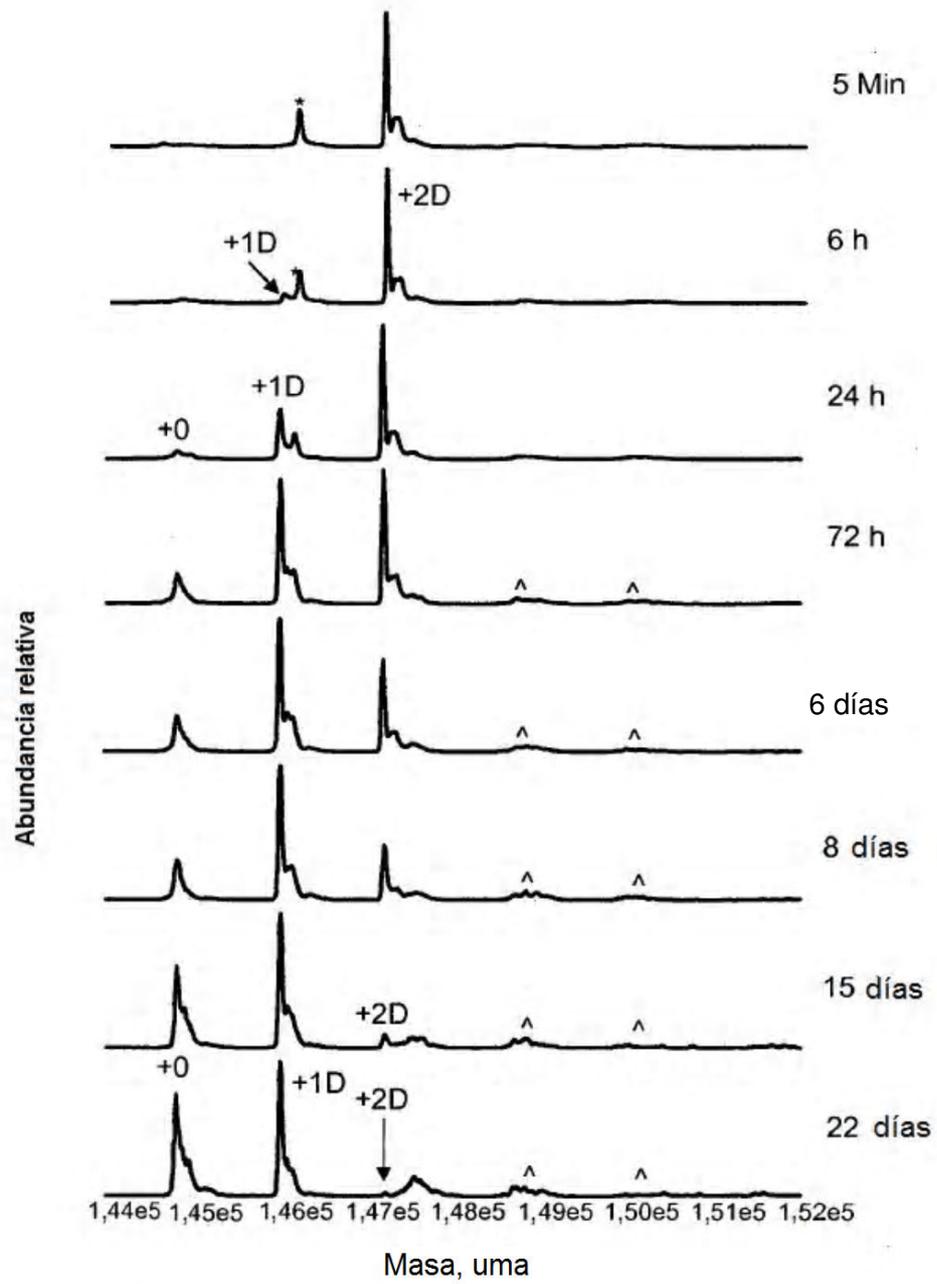


Figura 9

ELISA Total

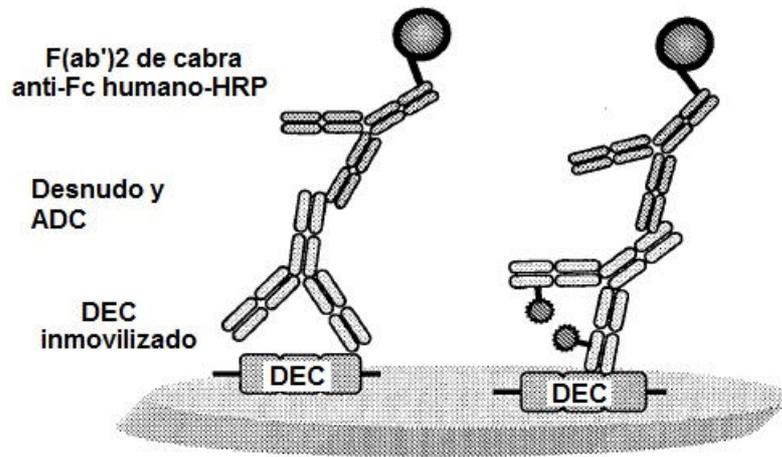


Figura 10a

ELISA Conjugado

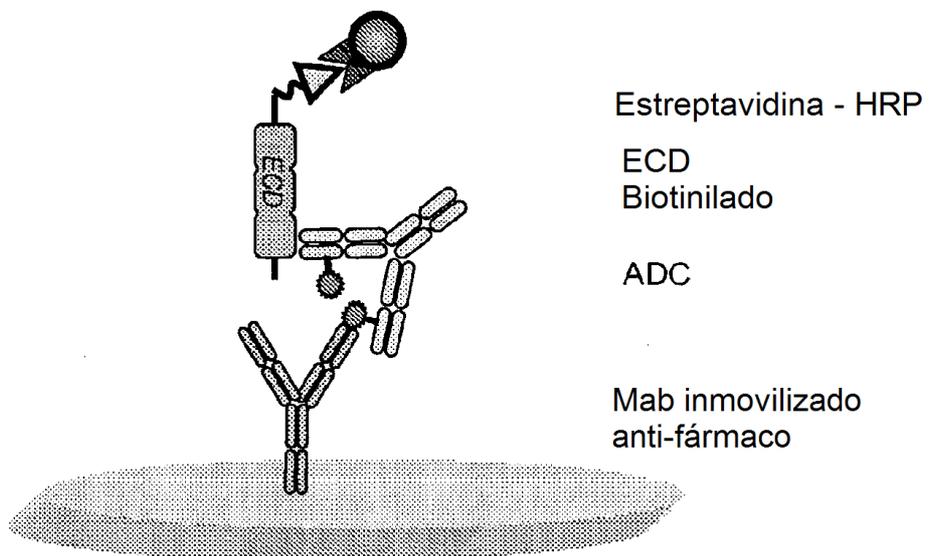


Figura 10b

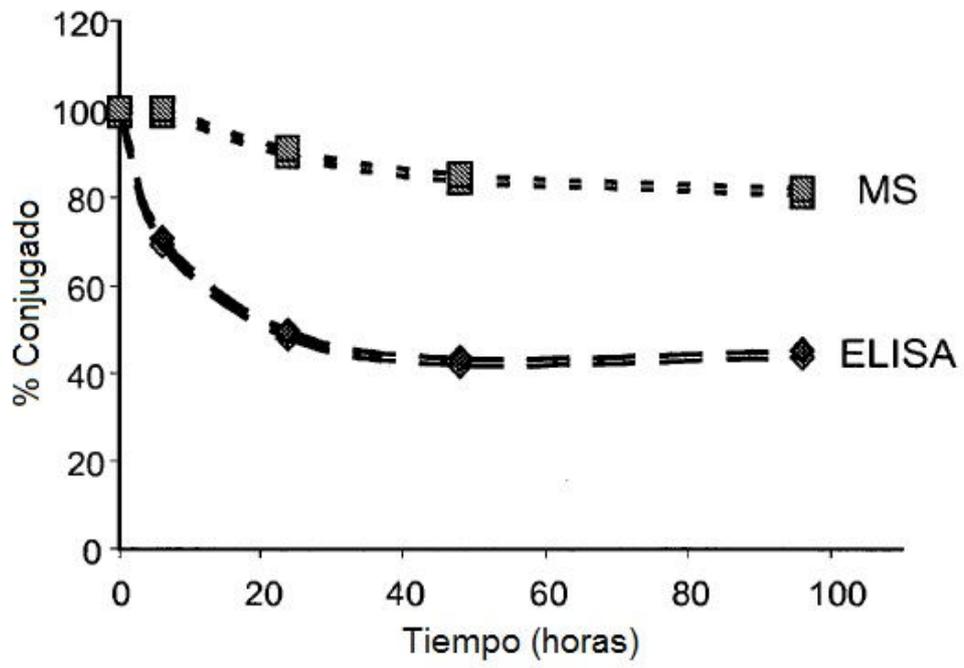


Figura 11