

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 077**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2005 E 05733039 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 1740954**

54 Título: **Espectrometría de masas de conjugados de anticuerpos**

30 Prioridad:

**07.04.2004 US 560530 P**  
**17.02.2005 US 654020 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.10.2015**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA WAY**  
**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**KADKHODAYAN, MIRYAM y**  
**MANN, EMILY**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 549 077 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

Espectrometría de masas de conjugados de anticuerpos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general a métodos para 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.

**Antecedentes de la invención**

Las terapéuticas anticancerosas dirigidas están diseñadas para reducir las toxicidades inespecíficas e incrementar la eficacia con respecto a la quimioterapia convencional para el cáncer. Este abordaje está ilustrado por la potente capacidad para dirigir anticuerpos monoclonales para liberar específicamente terapéuticas de molécula pequeña conjugadas y altamente potentes frente a una célula cancerosa. La farmacocinética y la biodistribución de un anticuerpo desempeñan un papel importante en la determinación de si su uso en la clínica tendrá éxito. Por tanto, el anticuerpo debe ser capaz de ser liberado en el sitio de acción y ser retenido allí durante el tiempo necesario para alcanzar su propósito. 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.

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.

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.

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 sondear 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.

La terapia de anticuerpos se ha establecido para el tratamiento dirigido y el diagnóstico de pacientes con cáncer, trastornos inmunológicos y trastornos angiogénicos. Un ejemplo, HERCEPTIN® (trastuzumab; Genentech, Inc.; South San Francisco, CA) es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que 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). HERCEPTIN® como agente único está indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2 y que han recibido uno o más regímenes de quimioterapia para su enfermedad metastásica. HERCEPTIN® en combinación con paclitaxel está indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2 y que no han recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica. HERCEPTIN® es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan ErbB2 que han recibido extenso tratamiento antineoplásico previo (Baselga et al (1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744).

El objetivo de la terapia y el diagnóstico con anticuerpos es explotar la combinación de alta especificidad y afinidad de la interacción anticuerpo-antígeno, para permitir la detección y/o tratamiento de una lesión o trastorno particular. El anticuerpo se usa solo, o se conjuga, es decir, cargado, con otro resto tal como un marcador de detección, modificador farmacocinético, radioisótopo, toxina, o fármaco. El uso de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), es decir, inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; US 4975278) permite, teóricamente, la administración dirigida del resto de fármaco a los tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, en los que la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como para las células tumorales que se desea eliminar (Baldwin et al (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al (eds), pp. 475-506). De este modo se busca una eficacia máxima con una toxicidad mínima. Los esfuerzos para diseñar y perfeccionar los ADC se han centrado en la selectividad de los anticuerpos monoclonales (MAb), así como en las propiedades de unión a fármacos o de liberación de fármacos. Se ha notificado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales unidos a fármacos, incluidos daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina, son útiles en estas estrategias (Rowland et al, (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina de la difteria, toxinas de plantas tales como ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamicina (Mandler et al (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maytansinoides (documento EP 1391213; Liu et al, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas y los fármacos pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos, incluida la unión a tubulina, la unión a ADN o la inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

Los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco incluyen MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), un anticuerpo hu CD33 unido a caliqueamicina, que se aprobó en 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda para inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; patentes de EE.UU. N° 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 unido a través de un puente disulfuro SPP al resto farmacológico maitansinoide DM1, está avanzado en los ensayos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm, BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) también unido DM1, se encuentra en desarrollo para el tratamiento potencial de los tumores de próstata. Los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE) análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales químicos cBR96 (específicos de Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en neoplasias malignas hematológicas), y se encuentran bajo desarrollo terapéutico (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al (2003) Blood 102:1458-1465).

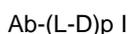
Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) mencionados anteriormente que están aprobados o en desarrollo para uso terapéutico son mezclas heterogéneas en las que el proceso de unión covalente del resto de fármaco al anticuerpo está en gran medida no controlado y los productos de conjugación resultantes están caracterizados de forma incompleta. Además, la carga de fármaco (relación Ab/fármaco) es un promedio estadístico para la colección de moléculas de ADC en una composición o formulación. Debido a la naturaleza heterogénea de las composiciones conjugadas anticuerpo-fármaco, las muestras para farmacocinética recogidas de fuentes biológicas después de la administración son difíciles de evaluar. Los ensayos ELISA se limitan a detección de la unión antígeno-anticuerpo (DiJoseph et al (2004) Blood 103:1807-1814). La espectroscopia UV puede medir la absorbancia total de determinados restos de fármacos o metabolitos activos por UV, pero no puede distinguir entre el fármaco libre y el conjugado anticuerpo-fármaco.

**Sumario de la invención**

5 Un aspecto de la invención incluye métodos para detectar, seleccionar y cuantificar compuestos conjugados de anticuerpos y composiciones, anticuerpos y fragmentos y metabolitos de los mismos, mediante separación por afinidad, cromatografía y espectrometría de masas como se define en las reivindicaciones. La espectrometría de masas es espectrometría de masas (EM) con monitorización de un solo ion (SIM). La práctica o técnica de SIM a veces se conoce como monitorización por ion seleccionado o monitorización iónica selectiva.

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

15 (i) procesar mediante selección con membrana de inmutafinidad una muestra biológica que se ha recogido de una fuente biológica en contacto previamente con un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula 1:



en la que

20 Ab es un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados a tumores o receptores de superficie celular;

D es un resto de fármaco seleccionado de un maitansinoide o auristatina;

25 L es un enlazador unido covalentemente a Ab y unido covalentemente a D, en el que L se forma a partir de un reactivo enlazador seleccionado de 4-(2-piridiltio) propanoato de N-succinimidilo (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), o L se selecciona de maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), y maleimidocaproil-valina-citruilina-para-aminobenciloxicarbonilo (MC-vc-PAB); y

p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8;

30 en el que una muestra de análisis se forma poniendo en contacto la muestra biológica con una membrana adsorbente de inmutafinidad que comprende un antígeno inmovilizado y la elución de la muestra de análisis;

35 (ii) 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, o un fragmento de anticuerpo o metabolito del mismo, y en la que p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8; y

(iii) establecer la masa o la distribución entre la masa y la carga, y cuantificar uno o más constituyentes separados de la muestra mediante espectrometría de masas con monitorización de ion único (SIM).

40 La invención se refiere a métodos para el cribado de una mezcla de compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco para determinar el aclaramiento relativo de los compuestos, o fragmentos o metabolitos de los mismos, en una fuente biológica, tal como un mamífero, tejido o cultivo celular.

45 La invención se refiere a métodos para la detección por espectrometría de masas, compuestos de una mezcla heterogénea de compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco que tienen la Fórmula I, en la que la mezcla incluye compuestos que tienen más de un valor de carga de fármaco, p, en la que p puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8; el método comprende la realización de espectrometría de masas en una muestra que comprende la mezcla heterogénea de compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco y la detección de más de un compuesto de la mezcla, o fragmentos o metabolitos de los mismos.

50 La invención se refiere a métodos para cuantificar los niveles tanto del fármaco libre como de los conjugados anticuerpo-fármaco en plasma mediante CL/EM con un único análisis.

La invención se refiere a métodos para estudiar el metabolismo *in vivo* de los conjugados anticuerpo-fármaco.

55 La invención se refiere a métodos de análisis farmacocinético de los conjugados anticuerpo-fármaco después de la administración a los mamíferos.

60 La invención se refiere a métodos de realización del perfil del paciente mediante la medición de la susceptibilidad y la respuesta al tratamiento terapéutico con conjugado anticuerpo-fármaco.

Los métodos de diagnóstico de la invención para diagnosticar la presencia o ausencia de una afección o enfermedad caracterizada por la sobreexpresión de una proteína o antígeno mediante la administración de un conjugado anticuerpo-fármaco a un mamífero, tejido o cultivo celular.

65 La invención incluye métodos de selección con membrana de inmutafinidad/CL/EM con membrana de inmutafinidad (IAM) y cromatografía líquida en fase inversa (CL) con etapas frontales acoplada a espectrometría

de masas de fondo (EM) de etapa de detección para aislar, limpiar y detectar conjugados de anticuerpo-fármaco en plasma como se ha definido en las reivindicaciones.

Los resultados de SIM para los conjugados de anticuerpos y los anticuerpos analizados por los métodos de la presente invención son sorprendentes e inesperados porque la SIM no ha sido reconocida como útil para moléculas tan grandes. Los métodos de la presente invención combinan alta resolución de los iones y la estabilidad de la cubierta iónica mediante control del potencial de desagrupación, el pH, y la fase móvil. Además, la selección de los iones de masa alta, en lugar de los más abundantes, el pico más alto, el ion, para SIM evita la interferencia de la matriz típica en el intervalo de masa inferior.

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 que sigue es descriptiva, ilustrativa y de ejemplo.

### 15 Breve descripción de las figuras

- Figura 1 muestra el espectro de masas Q1 del anticuerpo glicosilado intacto, trastuzumab, a diferentes concentraciones de ácido fórmico (FA) y el potencial de desagrupación (DP).
- Figura 2 muestra la linealidad de los iones Q1 extraídos de una curva estándar en una amplia gama de estados cargados de la cadena ligera de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAB a partir de una exploración de Q1.
- Figura 3 muestra ESI-MS de trastuzumab glicosilado y desconvolución espectral.
- Figura 4 muestra la calibración para la cuantificación por ESI-EM, a diferentes concentraciones de: trastuzumab intacto (aHer2) y trastuzumab intacto desglicosilado.
- Figura 5 muestra la calibración para la cuantificación mediante ESI-EM, a diferentes concentraciones de la cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC) de trastuzumab reducido.
- Figura 6 muestra la ESI-EM de un conjugado anticuerpo-enlazador, trastuzumab-SPP, después de la desglicosilación.
- Figura 7 muestra un espectro de desconvolución de los datos en bruto de la figura 6.
- Figura 8 muestra un espectro de desconvolución del conjugado trastuzumab-rodamina después de desglicosilación.
- Figura 9 muestra los iones cargados (m/z) antes de la desconvolución de los espectros del conjugado de rodamina trastuzumab después de la desglicosilación de la figura 8, que se utilizan para la cuantificación.
- Figura 10 muestra una curva de calibración en plasma para la cadena ligera de un conjugado anticuerpo monoclonal-fármaco. LIC= límite inferior de cuantificación
- Figura 11 muestra la precisión y exactitud en placa entera de un anticuerpo monoclonal (3 µg) en plasma
- Figura 12 muestra el efecto de la desglicosilación de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal, llevado a cabo en la membrana de afinidad.
- Figura 13 muestra un cromatograma (arriba) y los espectros de masas (centro y abajo) de trastuzumab-SPP-DM1 reducido.
- Figura 14 Muestra los espectros de masas de desconvolución de las cadenas ligera y pesada de trastuzumab-SPP-DM1 reducido.
- Figura 15 muestra los cromatogramas de: (arriba) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE; y los iones individuales extraídos del cromatograma de iones totales: cadena ligera, m/z = 1675 (segunda desde arriba); cadena ligera con un MMAE, m/z = 2251 (tercero desde arriba); y cadena pesada con tres MMAE, m/z = 1832 (abajo).
- Figura 16 muestra las curvas de calibración de CL/CL/EM para las muestras de plasma y solución de la cadena ligera de trastuzumab reducido.
- Figura 17 muestra las curvas de calibración de CL/CL/EM para las muestras de plasma y solución de la cadena ligera de trastuzumab reducido portadora de un MMAE (LC+1 MMAE).
- Figura 18 muestra una curva de calibración para el fármaco libre MMAE en plasma de rata, con un LIC de 0,1 ng/ml.
- Figura 19 muestra: (arriba) un cromatograma de iones totales de rastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE reducido y desnaturalizado; (centro) los espectros de masas de la cadena ligera con un MMAE; y (abajo) los espectros de masas de la cadena pesada, con tres MMAE.
- Figura 20 muestra los espectros de masas de desconvolución de fragmentos de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE reducido: (arriba) LC+1 MMAE y (abajo) HC+3 MMAE.
- Figura 21 muestra exploraciones Q1 de los espectros de masas a 3 concentraciones diferentes de trastuzumab en solución de plasma a 100 nM (arriba); 1000 nM (medio); y 2000 nM (abajo).
- Figura 22 muestra cromatogramas de las muestras de plasma de rata solución aisladas mediante selección, reducción y desnaturalización con membrana de inmunoafinidad (IAM) de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE.
- Figura 23 muestra monitorización de ion único (SIM) de fragmentos reducidos desglicosilados de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE en plasma de rata. (arriba) cadena ligera; (centro) cadena ligera con un MMAE; (abajo) cadena pesada con tres MMAE.

- Figura 24 muestra una curva de calibración para el ion 2251 m/z de la cadena ligera con un resto de fármaco MMAE (LC + 1 MMAE) de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE en plasma de rata, con un LIZ de 149 ng/ml.
- 5 Figura 25 muestra el análisis CL de dos preparaciones del conjugado anticuerpo anti-EphB2R-fármaco, 2H9-MC-vc-PAB-MMAE, con asignaciones de fragmentos; LC+0, LC+1, HC+0, HC+1, HC+2, HC+3, HC+4. El cromatograma superior es 3,5 MMAE/2H9. El cromatograma inferior es 5,1 MMAE/2H9.
- Figura 26 muestra la caracterización CL/EM Q1 de dos preparaciones de 2H9-MC-vc-PAB-MMAE, que pueden determinar la distribución de MMAE del anticuerpo. El espectro de masas superior, lote A, es 3,5 MMAE/2H9. El espectro de masas inferior, lote B, es 5,1 MMAE/2H9. Tenga en cuenta que múltiples picos de cada especie se deben a la adición de N-etilmaleimida (NEM).
- 10 Figura 27 muestra las etapas de preparación de muestras para el uso de selección por membrana de afinidad con boquilla de vacío y 96 pocillos para el aislamiento de anticuerpos antes del análisis CL/EM.
- Figura 28 muestra el análisis FC de las muestras de CEL/EM a partir de plasma de ratas Sprague-Dawley a las que se ha administrado trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (8,7 MMAE/trastuzumab), 2 mg/kg de MMAE.
- 15 Figura 29 muestra el análisis FC de las muestras de CL/EM a partir de plasma de ratas Sprague-Dawley a las que se ha administrado trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (5,3 MMAE/trastuzumab), 2 mg/kg de MMAE.
- Figura 30 muestra el gráfico de la relación porcentual del nivel de conjugación de MMAE de fragmentos de LC (cadena ligera) y de HC (cadena pesada) de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (5,3 MMAE/trastuzumab) de plasma de rata.
- 20 Figura 31 muestra una comparación de variaciones en la distribución del fármaco (MMAE) y el anticuerpo (trastuzumab) en el tiempo para dos preparaciones de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE: 8,7 y 5,3 de MMAE/trastuzumab) de plasma de rata.
- Figura 32 muestra los cromatogramas de interacción hidrofóbica (HIC HPLC) de: arriba) mezcla bruta de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 0, 2, 4, 6; (segundo desde arriba) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6; (centro) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4; (segundo desde abajo) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 2; (abajo) trastuzumab.
- 25 Figura 33 muestra el análisis CL/EM después de la reducción de: (arriba) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 2; (centro) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4; (abajo) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6.
- 30 Figura 34 muestra el análisis de EM de la cadena pesada de: (arriba) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 2; (centro) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4; (abajo) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6.
- Figura 35 muestra una comparación de las variaciones de la proporción entre el fármaco (MMAF) y el anticuerpo (trastuzumab) con el tiempo para el aclaramiento trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 2; trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4; y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6 a partir de muestras de plasma de ratas analizadas mediante selección con membrana selección membrana inmunoafinidad/CLEM.
- 35 Figura 36 muestra una comparación de las variaciones de la proporción entre el fármaco (MMAF) y las LC (cadena ligera) y el fármaco (MMAF) y la HC (cadena pesada) con el tiempo para el aclaramiento trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 2; trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4; y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6 a partir de muestras de plasma de ratas analizadas mediante selección con membrana selección membrana inmunoafinidad/CLEM.
- 40 Figura 37 muestra una comparación del fármaco (MMAE) con LC (cadena ligera) y el fármaco (MMAE) con la HC (cadena pesada) con el tiempo para las muestras de plasma de rata con trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE con carga promedio de fármaco de 5,3; y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4.
- 45 Figura 38 muestra la velocidad relativa de pérdida de fármaco de la LC (cadena ligera) y pérdida de fármaco (MMAE) de la HC (cadena pesada) de muestras de plasma de rata con trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE con carga promedio de fármaco de 5,3; y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4.
- 50 Figura 39 muestra los análisis CL de cinco reacciones de conjugación de éster NHS de tetrametilrodamina (TAMRA) con el anticuerpo, 2H7, en exceso molar de 1, 5, 8, 12, y 20 equivalentes de TAMRA-NHS y el anticuerpo.
- 55 Figura 40 muestra el análisis de espectrometría de masas con desconvolución que representa la intensidad en cuentas por segundo (cps) frente a unidades de masa atómica (uma) de: 4D5 Fab (arriba a la izquierda), 4D5 reducido (abajo a la izquierda), 4D5 Fab-DM1 (abajo a la derecha), y 4D5 Fab-DM1 reducido (abajo a la derecha).
- 60 Figura 41 Muestra el análisis por espectrometría de masas que representa la intensidad en cuantas por segundo (cps) frente a las unidades de masa atómica (uma) de un metabolito de trastuzumab-MC-MMAF con una masa de 8177,9 uma, capturada en una membrana de afinidad con el anticuerpo anti-auristatina a partir de una muestra en plasma *in vivo* de macaco.

- Figura 42 Muestra el área del pico del metabolito de 8178 unidades de masa (+5 ion de 1636 m/z) capturado en una membrana de afinidad del anticuerpo anti-auristatina de muestras de plasma *in vivo* de macaco, recogidas a puntos de tiempo de hasta 120 horas tras la administración de trastuzumab-MC-MMAF.
- 5 Figura 43 muestra un gráfico de fragmentos de la cadena ligera detectados mediante espectrometría de masas de muestras de plasma recogidas en los puntos de tiempo (horas) tras la administración de trastuzumab-SMCC-DM1 a macacos. Los fragmentos de la cadena ligera se caracterizan por su masa conjugada a 0,1, y 2 restos de fármaco DM1 y se les asignó una proporción en porcentaje con los fragmentos de la cadena ligera totales de trastuzumab-SMCC-DM1.
- 10 Figura 44 muestra un gráfico de fragmentos de la cadena ligera detectados mediante espectrometría de masas de muestras de trastuzumab-SMCC-DM1 en tampón, a puntos de tiempo de incubación (horas). Los fragmentos de la cadena ligera se caracterizan por su masa conjugada a 0, 1 y 2 restos de fármaco DM1 y se les asignó una proporción en porcentaje con los fragmentos de la cadena ligera totales de trastuzumab-SMCC-DM1.
- 15 Figura 45 muestra un gráfico de fragmentos de la cadena pesada detectados mediante espectrometría de masas de muestras de plasma recogidas en los puntos de tiempo (horas) tras la administración de trastuzumab-SMCC-DM1 a macacos. Los fragmentos de la cadena pesada se caracterizan por su masa conjugada a 0,1, y 2 restos de fármaco DM1 y se les asignó una proporción en porcentaje con los fragmentos de la cadena pesada totales de trastuzumab-SMCC-DM1.
- 20 Figura 46 muestra un gráfico de fragmentos de la cadena pesada detectados mediante espectrometría de masas de muestras de trastuzumab-SMCC-DM1 en tampón, a puntos de tiempo de incubación (horas). Los fragmentos de la cadena pesada se caracterizan por su masa conjugada a 0, 1 y 2 restos de fármaco DM1 y se les asignó una proporción en porcentaje con los fragmentos de la cadena pesada totales de trastuzumab-SMCC-DM1.
- 25 Figura 47 muestra un gráfico del anticuerpo que queda conjugado con un resto de fármaco en: (líneas superiores) muestras de tampón del conjugado anticuerpo-fármaco, trastuzumab-MC-MMAF; y (líneas inferiores) muestras de plasma recogidas de macacos tras la administración de trastuzumab-MC-MMAF a puntos de tiempo de hasta 70 horas. La fracción de anticuerpo conjugado con un resto de fármaco se midió mediante el método de CL/EM (líneas continuas) y mediante una prueba de ELISA doble (líneas discontinuas).
- 30 Figura 48 muestra un gráfico de cuantificación en  $\mu\text{g/ml}$  de un conjugado anticuerpo Fab fármaco, 4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAE en muestras de plasma recogidas de macacos tras la administración de trastuzumab-MC-MMAF, a puntos de tiempo hasta 60 horas mediante la prueba CL/EM (línea discontinua) y la prueba ELISA (línea continua).

### 35 Descripción detallada

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. Por el contrario, con la invención se pretende cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes.

40

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.

45

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.

50

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.

### 55 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:

60 En el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies.

65 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", 5ª Ed., Garland Publishing, New York). En general, un

antígeno diana tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítomos, reconocidos por CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítomo diferente tiene una estructura diferente. Por tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

5 Como se usa en el presente documento, el término "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 inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo dichas dianas, entre  
10 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 (por ejemplo, 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

15 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')<sub>2</sub> 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 epítomo de cualquiera de los anteriores que se unen  
20 inmunoespecíficamente 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, así como los dominios constantes completos de las cadenas pesada y ligera.

25 La expresión "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  
30 diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), 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,  
35 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,  
45 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 81:6851-6855). 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.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, por ejemplo que comprende el fragmento de unión a antígeno o una región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv; moléculas de anticuerpo de cadena única; diacuerpos; anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de una sola cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

En el presente documento, un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno, así como un dominio constante de la cadena ligera (CL) y 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 Clq; 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.

En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de éstos pueden además dividirse en "subclases" (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

La expresión "variante de la secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren hasta cierto punto de un polipéptido de secuencia nativa. Ordinariamente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia con al menos un dominio de unión al receptor de un anticuerpo nativo o con al menos un dominio de unión a ligando de un receptor nativo y, preferentemente, serán al menos aproximadamente 80 % más preferentemente, al menos aproximadamente 90 % homóloga en secuencia con dichos dominios de unión al receptor o ligando. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa. Los aminoácidos se designan por los nombres convencionales, códigos de una letra y de tres letras.

"Identidad de secuencia" se define como el porcentaje de residuos en la variante de la secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir los huecos, en caso necesario, para alcanzar la identidad de secuencia máxima en porcentaje. En la técnica se conocen bien los métodos y programas informáticos para la alineación. Uno de estos programas informáticos es "Align 2," de Genentech, Inc., que se presentó con documentación para el usuario y la oficina de copyright de EE.UU., Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un determinante antigénico concreto (por ejemplo, un antígeno de célula de cáncer, un antígeno viral, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un carbohidrato, una sustancia química, ácido nucleico, o fragmentos de los mismos). Un anticuerpo monoclonal (Mab) frente a un antígeno de interés se puede preparar usando cualquier técnica conocida en la materia que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, entre otras, la técnica del hibridoma inicialmente descrita Koehler y Milstein (1975, Nature 256,495-497), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al, 1983, Immunology Today 4: 72), y la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgG, IgM, IgE, IgA e IgD, y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los MAb de uso en la presente invención puede cultivarse in vitro o in vivo.

Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos monoclonales quiméricos de ser humano – ratón (o de otras especies). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse mediante cualquiera de numerosas técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, Teng et al, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80,7308-7312; Kozbor et al, 1983, Immunology Today 4, 72-79; y Olsson et al, 1982, Meth. Enzymol. 92, 3-16).

El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos pueden tener una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, como la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación (documento WO 94/04690; Suresh et al, Methods in Enzymology, 1986, 121:210; Rodrigues et al, 1993, J. of Immunology 151:6954-6961; Carter et al, 1992, Bio/Technology 10:163-167; Carter et al, 1995, J. of Hematotherapy 4:463-470; Merchant et al, 1998, Nature Biotechnology 16:677-681. Methods for making bispecific antibodies are known in the art (Milstein et al, 1983, Nature 305:537-539; documento WO 93/08829; Traunecker et al, EMBO J. 10:3655-3659 (1991)). Usando tales técnicas, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar para la conjugación como ADC en el tratamiento o prevención de la enfermedad como se define en el presente documento.

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión puede ser con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . La primera región constante de la cadena pesada ( $C_{H1}$ ) puede contener el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las condensaciones. Los ácidos nucleicos con secuencias que codifican las condensaciones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y son co-transfectados en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el

ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. No obstante, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales tiene como resultado rendimientos altos o cuando las proporciones no tienen una importancia particular.

Los anticuerpos híbridos o bifuncionales pueden derivarse biológicamente, es decir, mediante técnicas de fusión celular, o químicamente, especialmente con agentes de reticulación o reactivos de formación de puentes disulfuro y pueden comprender anticuerpos completos o fragmentos de los mismos (documentos EP 105360; WO 83/03679; EP 217577).

El anticuerpo puede ser un fragmento funcionalmente activo, derivado o análogo de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a los antígenos celulares de cáncer, antígenos virales, o antígenos microbianos u otros anticuerpos unidos a las células tumorales o a la matriz. A este respecto, "funcionalmente activo" quiere decir que el fragmento, derivado o análogo es capaz de provocar anticuerpos anti-anti-idiotipo que reconozcan el mismo antígeno que reconoce el anticuerpo del que deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una realización de ejemplo, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede potenciarse mediante la delección de secuencias marco y CDR que están en el extremo C de la secuencia CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, los péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR pueden usarse en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método ensayo de unión conocido en la técnica (por ejemplo, el ensayo núcleo BIA) (véase, por ejemplo, Kabat et al, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat E et al, 1980, J. of Immunology 125(3):961-969).

Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, entre otros, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada, que se pueden producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y los fragmentos Fab, que se pueden generar mediante la reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Otros anticuerpos útiles son dímeros de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos, o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como Fvs o anticuerpos de cadena sencilla (SCA) (por ejemplo, como se describe en el documento US 4946778; Bird, (1988), Science 242:423-42; Huston et al, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al, (1989) Nature 334:544-54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

Adicionalmente los anticuerpos recombinantes, como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones humanas y no humanas, que se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinantes estándar, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo quimérico puede ser una molécula en la que diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana (documentos US 4816567; y US 4816397). Los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia, por ejemplo usando métodos descritos en los documentos WO 87/02671; EP 184,187; EP 171496; EP 173494; WO 86/01533; US 4816567; EP 12023; Berter et al, (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al, (1987) J. Immunol 139:3521-3526; Sun et al, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al, (1987) Cancer. Res. 47:999-1005; Wood et al, (1985) Nature 314:446-449; y Shaw et al, (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al, (1986) BioTechniques 4:214; documento US 5225539; Jones et al, (1986) Nature 321:552-525; Verhoevan et al. (1988) Science 239:1534; y Beidler et al, 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos también se pueden producir usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas endógenas, pero que pueden expresar genes de las cadenas ligera y pesada. Los ratones transgénicos se inmunizan del modo normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos completamente dirigidos contra el antígeno se pueden obtener usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de células B y, después, sufren un cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una revisión de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806. Otros anticuerpos humanos se pueden obtener comercialmente de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA).

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconozca el mismo epítipo. (Jespers et al. (1994) Biotechnology 12:899-903). Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de expresión

en fagos (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)).

El anticuerpo puede ser una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcionalmente activo del mismo, por ejemplo uno en el que el anticuerpo esté condensado a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico) en cualquiera de los extremos N o C con una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma, tal como al menos una porción de 10, 20, o 50 aminoácidos de la proteína) que no es el anticuerpo. El anticuerpo o fragmento del mismo puede estar unido covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante.

Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que están modificados, es decir mediante unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicha unión covalente permita al anticuerpo retener su inmunoespecificidad de unión al antígeno. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado además mediante, por ejemplo, glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluidas, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

Los anticuerpos en ADC incluyen anticuerpos que tienen modificaciones (p. ej., sustituciones, deleciones o adiciones) en residuos de aminoácidos que interaccionan con receptores Fc. En concreto, los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones en residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn (véase: documento WO 97/34631). Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula de cáncer se pueden obtener comercialmente, por ejemplo en Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) o producir mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica, tal como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinantes. La secuencia nucleotídica que codifican anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se pueden obtener de, por ejemplo, la base de datos GenBank de una base de datos como esa, una fuente comercial o de otro tipo, publicaciones bibliográficas o clonación y secuenciación de rutina.

El término "receptor" incluye cualquier péptido, proteína, glicoproteína, polícarbohidrato, o lípido que se expresa o sobreexpresa de forma única sobre la superficie de una célula única y está expuesto sobre la superficie de una célula de una manera que permita la interacción con un agente dirigido circulante, tal como un conjugado anticuerpo-fármaco. Las células portadoras de receptores incluyen células tumorales.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios. "Mamífero" para los propósitos de administración de, o contacto con, conjugados anticuerpo-fármaco se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, primates no humanos, y cualquier otro animal que tiene tejidos de mamíferos.

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

La expresión "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.

El término "marcador" significa cualquier resto que se puede unir covalentemente a un anticuerpo y que funciona para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interaccionar 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.

"Alquilo" es resto hidrocarburo de C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Ejemplos de radicales alquilo incluyen restos de hidrocarburos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> tales como: metilo (Me, -CH<sub>3</sub>), etilo (Et, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1-pentilo (n-pentilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-pentilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-2-butilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metil-2-butilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metil-1-butilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-1-butilo (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-hexilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-hexilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-hexilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 2-metil-2-pentilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metil-3-pentilo (-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-3-pentilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1-heptilo, 1-octilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

"Arilo" significa un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillo aromático parental. Algunos grupos arilo están representados en las estructuras de ejemplo como "Ar". Entre los grupos arilo típicos se incluyen radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo.

"Alquilo sustituido" y "arilo sustituido" significan alquilo y arilo, respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos de forma independiente con un sustituyente distinto a hidrógeno. Sustituyentes típicos incluyen, entre otros, -X, -R, -O-, -OR-, -SR-, -S-, -NR<sub>2</sub>, -NR<sub>3</sub>, =NR, -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R, -OS(=O)<sub>2</sub>OR, -S(=O)<sub>2</sub>NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO<sub>2</sub>R, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=S)NR<sub>2</sub>, -C(=NR)NR<sub>2</sub>, en los que cada X es, de forma independiente, halógeno: P, Cl, Br, I; y cada R es, de forma independiente, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, arilo, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub> o un grupo protector. Los grupos alquileo, alquilenilo y alquilinilo como se ha descrito anteriormente también pueden estar sustituidos de forma similar.

"Heteroarilo", "heterociclilo", y "heterociclo" todos se refieren a un sistema de anillo en el que uno o más átomos del anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 5 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros de anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros de anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularmente los capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 al presente), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566.

Ejemplos de heterociclos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitaciones, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo de azufre oxidado, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahidrozilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroquinolinilo, octahydroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiacino, 2H,6H-1,5,2-ditiacino, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizino, isoindolilo, 3H-indolilo, 1 H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizino, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazino, fenotiazino, furazanilo, furazano, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoilo:

A modo de ejemplo y sin limitaciones, los heterociclos unidos a carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, en la posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, en la posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, en la posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, en la posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol, pirrol o tetrahidropirrol, en la posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, en la posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol, en la posición 2 o 3 de una aziridina, en la posición 2, 3 o 4 de una azetidina, en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o en la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 de una isoquinolina. Todavía más habitualmente, los heterociclos unidos a carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo o 5-tiazolilo.

A modo de ejemplo y sin limitaciones, los heterociclos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de un grupo aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperacina, indol, indolita, 1H-indazol, la posición 2 de un grupo isoindol o isoindolina, en la posición 4 de un grupo morfolina y la posición 9 de un grupo carbazol o β-carbolina. Todavía más habitualmente, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

"Carbociclo" y "carbociclilo" significan un anillo saturado o insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o de 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos de anillo, todavía más habitualmente 5 o 6 átomos de anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos de carbono, por ejemplo dispuestos en forma de un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] o 9 o 10 átomos de anillo dispuestos en forma de un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

“Grupos funcionales reactivos” incluyen, pero no se limitan a, olefinas, acetilenos, alcoholes, fenoles, éteres, óxidos, haluros, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, carbonatos, amidas, cianatos, isocianatos, tiocianatos, isotiocianatos, aminas, hidrazinas, hidrazonas, hidrazidas, diazo, diazonio, nitro, nitrilos, mercaptanos (tioles), sulfuros, disulfuros, sulfóxidos, sulfonas, ácidos sulfónicos, ácidos sulfínicos, acetales, cetales, anhídridos, sulfatos, ácidos sulfénicos, isonitrilos, amidinas, imidas, imidatos, nitronas, hidroxilaminas, oximas, ácidos hidroxámicos, ácidos tiohidroxámicos, alenos, ortoésteres, sulfitos, enaminas, inaminas, ureas, pseudoureas, semicarbazidas, carbodiimidias, carbamatos, iminas, azidas, compuestos azo, compuestos azoxi y compuestos nitrosos. Grupos funcionales reactivos de ejemplo incluyen ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), carbonatos de para-nitrofenilo (PNP), carbonatos de pentafluorofenilo (PFP) y maleimidias. Véase: Sandler y Karo, Eds. "Organic Functional Group Preparations", Academic Press, San Diego, 1989.

"Enlazador", "unidad enlazadora", o "enlace" significa un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un resto de fármaco. En diversas realizaciones, un enlazador como L. Los enlazadores incluyen un radical divalente tal como un alquileo, un arildiilo, un heteroarildiilo, restos tales como:  $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ , 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.

Abreviaturas de enlazadores de ejemplo incluyen: MC = 6-maleimidocaproilo, MP = maleimidopropanoilo, valcit = valina-citrulina, sitio dipéptido en enlazador escindible por proteasa, ala-phe = alanina-fenilalanina, tio dipéptido en enlazador escindible por proteasa, PAB = p-aminobenciloxicarbonilo (porción "autoinmoladora" del enlazador), SPP = pentanoato de N-Succinimidilo 4-(2-piridiltio), SMCC = 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato de N-Succinimidilo, SIAB = (4-yodo-acetil) aminobenzoato de N-Succinimidilo.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de superposición de la pareja imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que se pueden superponer sobre su pareja imagen especular.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica pero que difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

"Diaestereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son especulares unas de otras. Los diaestereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diaestereómeros se pueden separar mediante procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

"Enantiómeros" se refieren a dos estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles uno de otro.

Las definiciones estereoquímicas y consensos usados en la presente memoria descriptiva generalmente siguen las indicaciones de S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo se usan los prefijos D y L o R y S para indicar la configuración absoluta de la molécula sobre su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de la luz polarizada en el plano por el compuesto, significando el (-) o l que el compuesto es levorrotatorio. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos a excepción de que son imágenes especulares uno de otro. Un estereoisómero específico pueden también denominarse enantiómero y una mezcla de dichos isómeros a menudo se denomina una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que se puede producir cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o procedimiento químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un ADC. Sales de ejemplo incluyen, entre otras, las sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tannato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentsinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen bis -(2-hidroxi-3- naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraion. El contraion puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabiliza la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en que varios átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

"Solvato farmacéuticamente aceptable" se refiere a una asociación de uno o más moléculas de disolvente y un ADC. Ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

5 En el presente documento se usan los acrónimos, términos y abreviaturas siguientes y tienen las definiciones indicadas:

10 Boc es *N*-(*t*-butoxicarbonilo), cit es citrulina (ácido 2-amino-5-ureido pentanoico), dap es dolaproina, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es *N,N*-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetiléter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es *N,N*-dimetilvalina, DTNB es ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilentriaminopentaacético, DTT es ditiotreitól, EDCI es 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-EM  
15 es espectrometría de masas por electropulverización, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N'*,*N'*-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía de líquidos de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH<sub>3</sub>CN) es acetonitrilo, CL/EM es cromatografía de líquidos y espectrometría de masas, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetilo (o 4-metoxitritil), nor es (1*S*, 2*R*)-(+)-norefedrina, PBS es solución salina tamponada con fosfato (Ph 7.4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es *p*-nitrofenilo, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo *tris*-pirrolidino fosfonio, SEC es cromatografía de exclusión por tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía en capa fina, UV es ultravioleta y val es valina.

#### 25 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  
30 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.

35 Anticuerpos de proteína, polipéptido o péptido no inmunorreactivos útiles que comprenden Ab en los conjugados e anticuerpo-fármaco de fórmula I incluyen, entre otros, transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, IL-2, IL-6, factores transformantes del crecimiento ("TGF"), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , factores de crecimiento de vaccinia ("VGF"), factores de crecimiento de insulina y de tipo insulina I y II, lectinas y apoproteína de las lipoproteínas de  
40 baja densidad.

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  
45 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  
50 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.

55 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 Registro 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  
60 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.

65

## ANTÍGENOS ASOCIADOS CON TUMORES (1)-(35):

- (1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, nº de registro en Genbank NM\_001203) ten Dijke, P., et al *Science* 264 (5155):101-104 (1994), *Oncogene* 14 (11):1377-1382 (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/pid=NP\_001194.1 – Referencias cruzadas: MIM:603248; NP\_001194.1; NM\_001203\_1
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5, nº de registro en Genbank NM\_003486) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 (2), 283-288 (1999), *Nature* 395 (6699):288-291 (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 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 93-95); 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
- (3) STEAP1 (seis antígenos epiteliales transmembrana del la próstata, nº de registro en Genbank NM\_012449); *Cancer Res.* 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25):14523-14528; 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 618-619); 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
- (4) 0772P (CA125, MUC16, nº de registro 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; AF361486\_1
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina, nº de registro en Genbank NM\_005823) Yamaguchi, N., et al. *Biol. Chem.* 269 (2), 805-808 (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (20): 11531-11536 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1):136-140 (1996), *J. Biol. Chem.* 270 (37):21984-21990 (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
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia de transportadores de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente de sodio de tipo II, nº de registro 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 WO2004/022778 (Reivindicación 2); documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 326); documento EP0875569 (Reivindicación 1; Página 17-19); documento WO2001/57188 (Reivindicación 20; Página 329); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento WO2001/75177 (Reivindicación 24; Página 139-140); Referencias cruzadas: MIM:604217; NP\_006415.1; NM\_006424\_1
- (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 registro 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 41-43, 48-58); documento WO2003/054152 (Reivindicación 20); documento WO2003/101400 (Reivindicación 11); Registro: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;

- 5 (8) PSCA hlg (gen 2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12, nº de Registro 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
- 10 (9) ETBR (receptor de tipo B de la endotelina); nº de registro en Genbank AY275463); Nakamuta M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991; Arai H., et al *Jpn. Circ. J.* 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al *J. Biol. Chem.* 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A, Yanagisawa M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178,656-663, 1991; Elshourbagy N.A, et al *J. Biol. Chem.* 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al *Gene* 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82,3116-3123,1997; Okamoto Y., et al *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al *Am. J. Med. Genet* 108,223-225,2002; Hofstra R.M.W., et al *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., et al *Cell* 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al, *Hum. Mol. Genet.* 4,2407-2409,1995; Auricchio A, et al *Hum. Mol. Genet.* 5:351-354,1996; Amiel J., et al *Hum. Mol. Genet.* 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et al *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al *Hum. Genet* 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al *Mol. Med.* 7,115-124,2001; Pingault V., et al (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206; documento WO2004045516 (reivindicación 1); documentoWO2004048938 (Ejemplo 2); documento WO2004040000 (Reivindicación 151); documento WO2003087768 (Reivindicación 1); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO200261087 (Fig. 1); documento WO2003016494 (Fig 6); documento WO2003025138 (Reivindicación 12; Página 144); documento WO200198351 (Reivindicación 1; Página 124-125); documento EP522868 (Reivindicación 8; Fig. 2); documento WO200177172 (Reivindicación 1; Página 297-299); documento US2003109676; US6518404 (Fig. 3); documento US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); documento WO2004001004;
- 20 (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315); nº de registro 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
- 30 (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales transmembrana de la próstata 2, seis proteínas prostáticas transmembrana, nº de registro en Genbank AF455138) *Lab. Invest* 82 (11):1573-1582 (2002); documento WO2003087306; documento US2003064397 (Reivindicación1; Fig. 1); documento WO200272596 (Reivindicación 13; Página 54-55); documento WO200172962 (Reivindicación 1; Fig. 4B); documento WO2003104270 (Reivindicación 11); documento WO2003104270 (Reivindicación 16); documento US2004005598 (Reivindicación 22); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento US2003060612 (Reivindicación 12; Fig. 10); documento WO200226822 (Reivindicación 23; Fig. 2); documento WO200216429 (Reivindicación 12; Fig. 10); Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138\_1
- 35 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, nº de registro en Genbank NM\_017636); Xu, X.Z., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (19):10692-10697 (2001), *Cell* 109 (3):397407 (2002), *J. Biol. Chem.* 278 (33):30813-30820 (2003); documento US2003/143557 (Reivindicación 4); documento WO2000/40614 (Reivindicación 14; Página 100-103); 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
- 45 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, nº de registro en Genbank NP\_003203 o NM\_003212); Ciccodicola, A., et al *EMBO J.* 8 (7):1987-1991 (1989), *Am. J. Hum. Genet.* 49 (3): 555-565 (1991); documento US2003/224411 (Reivindicación 1); documento WO2003/083041 (Ejemplo 1); documento WO2003/034984 (Reivindicación 12); documento WO2002/88170 (Reivindicación 2; Página 52-53); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig.58); documento WO2002/1641 (Reivindicación 1; Página 94-95, 105); documento WO2002/22808 (Reivindicación 2; Fig.1); documento US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); documento US5792616 (Fig. 2); Referencias cruzadas: MIM:187395; NP\_003203.1; NM\_003212\_1
- 50 (14) CD21 (CR2 (receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 nº de registro M26004); Fujisaku et al., (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al., *J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al., *Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al., (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320; documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento
- 55 (14) CD21 (receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 nº de registro M26004); Fujisaku et al., (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al., *J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al., *Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al., (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320; documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento
- 60 (14) CD21 (receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 nº de registro M26004); Fujisaku et al., (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al., *J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al., *Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al., (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320; documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento
- 65 (14) CD21 (receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 nº de registro M26004); Fujisaku et al., (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al., *J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al., *Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al., (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320; documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento

US2004/005538 (Ejemplo 1); documento WO2003/062401 (Reivindicación 9); documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento WO91/02536 (Fig.9.1-9.9); documento WO2004/020595 (Reivindicación 1); Registro: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

5 (15) CD79b (CD79B, CD79 $\beta$ , Igb (beta asociado con inmunoglobulina), B29, n<sup>o</sup> de registro en Genbank NM\_000626 o 11038674); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 100 (7):4126-4131, *Blood* (2002) 100 (9):3068-3076, Muller *et al.*, (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6):1621-1625); 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

15 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, n<sup>o</sup> de registro en Genbank NM\_030764); *Genome Res.* 13 (10):2265-2270 (2003), *Immunogenetics* 54 (2):87-95 (2002), *Blood* 99 (8):2662-2669 (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., *et al.*, (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (3):768-775; 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, n<sup>o</sup> de registro en Genbank M11730)  
 Coussens L., *et al.*, *Science* (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T., *et al.*, *Nature* 319, 230-234, 1986; Semba K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6497-6501, 1985; Swierz J.M., *et al.*, *J. Cell Biol.* 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., *et al.*, *Nature* 421, 756-760, 2003; Ehsani A., *et al.*, (1993) *Genomics* 15.426, 426-429; documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/027049 (Fig.11); 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 95-107); documento WO2002/12341 (Reivindicación 68; Fig.7); documento WO2002/13847 (Página 71-74); documento WO2002/14503 (Página 114-117); 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 31-38); documento WO9630514 (Reivindicación 2; Página 56-61); documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004/043361 (Reivindicación 7); documento WO2004/022709; documento WO2001/00244 (Ejemplo 3; Fig.4); Registro: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.

40 (18) NCA (CEACAM6, n<sup>o</sup> de registro Genbank M18728); Barnett T., *et al.*, *Genomics* 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16899-16903, 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); Registro: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;

50 (19) MDP (DPEP1, N<sup>o</sup> de registro en Genbank BC017023); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26):16899-16903 (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

55 (20) IL20R $\alpha$  (IL20Ra, ZCYTOR7, N<sup>o</sup> de registro en Genbank AF184971); Clark H.F., *et al.*, *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., *et al.*, *Nature* 425, 805-811, -2010; Blumberg H., *et al.*, *Cell* 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., *et al.*, *J. Immunol.* 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., *et al.*, (2003) *Biochemistry* 42:12617-12624; Sheikh F., *et al.*, (2004) *J. Immunol.* 172,2006, 2006-2010; 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 45-47); documento US2002/042366 (Página 20-21); documento WO2001/46261 (Página 57-59); documento WO2001/46232 (Página 63-65); documento WO98/37193 (Reivindicación 1; Página 55-59); Registro: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

65 (21) Brevican (BCAN, BEHAB, n<sup>o</sup> de registro 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.* 99,16899, 16899-16903, 2002; documento US2003/186372 (Reivindicación 11); documento US2003/186373 (Reivindicación 11); documento US2003/119131 (Reivindicación 1; Fig.52);

- 5 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);
- 10 (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, nº de registro en Genbank NM\_004442) (Chan, J. y Watt, V.M., *Oncogene* 6 (6), 1057-1061 (1991) *Oncogene* 10 (5):897-905 (1995), *Annu. Rev. Neurosci.* 21:309-345 (1998), *Int. Rev. Cytol.* 196:177-244 (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
- 15 (23) ASLG659 (B7h, nº de registro en 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 20 WO2001/94641 (Reivindicación 12; Fig.7b); documento WO2002/02624 (Reivindicación 13; Fig.1A-1B); documento US2002/034749 (Reivindicación 54; Página 45-46); documento WO2002/06317 (Ejemplo 2; Página 320-321, Reivindicación 34; Página 321-322); documento WO2002/71928 (Página 468-469); documento WO2002/02587 (Ejemplo 1; Fig.1); documento WO2001/40269 (Ejemplo 3; Páginas 190192); documento WO2000/36107 (Ejemplo 2; Página 205-207); documento WO2004/053079 (Reivindicación 12); documento 25 WO2003/004989 (Reivindicación 1); documento WO2002/71928 (Página 233-234, 452-453); documento WO 01/16318;
- 30 (24) PSCA (precursor del antígeno de células madre de próstata, nº de registro en Genbank. AJ297436) Reiter R.E., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., *et al.*, *Oncogene* 19, 1288-1296, 2000; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) 275(3):783-788; 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 35 WO98/51824 (Reivindicación 10; Página 94); documento WO98/40403 (Reivindicación 2; Fig.1B); Registro: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1
- 40 (25) GEDA (nº de Registro 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
- 45 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor de BLYS 3, BR3, nº de Registro 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); 50 Referencias cruzadas: MIM:606269; NP\_443177.1; NM\_052945\_1
- 55 (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de los linfocitos B, nº de Registro en Genbank NP-001762.1); Stamenkovic, 1. 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
- 60 (28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , 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 mpgpgv...dvqlkp (1..226; 226 aa), pl: 4,84, PM: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma génico: 19q13.2, nº de Registro 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 65

(1992) *J. Immunol.* 148(2) 633 - 637; Sakaguchi et al (1988) *EMBO J.* 7(11): 34-57 - 34-64;

- 5 (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 mnypltl...atstlff (1..372; 372 aa), pl: 8.54 PM: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma génico: 11q23.3, nº de registro 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 12-13); documento WO2000/22129 (Ejemplo 1, Páginas 152-153, Ejemplo 2, Páginas 254-256); documento WO99/28468 (Reivindicación 1, Página 38); documento US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); documento WO94/28931 (Páginas 56-58); documento WO92/17497 (Reivindicación 7, Fig.5); Dobner *et al.*, (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2795-2799; Barella *et al.*, (1995) *Biochem. J.* 309:773-779;
- 10 (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 registro en Genbank NP\_002111.1); Tonnelle *et al.*, (1985) *EMBO J.* 4(11):2839-2847; Jonsson *et al.*, (1989) *Immunogenetics* 29(6):411-413; Beck *et al.*, (1992) *J. Mol. Biol.* 228:433-441; Strausberg *et al.*, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:16899-16903; Serenius *et al.*, (1987) *J. Biol. Chem.* 262:8759-8766; Beck *et al.*, (1996) *J. Mol. Biol.* 255:1-13; Naruse *et al.*, (2002) *Tissue Antigens* 59:512-519; WO99/58658 (Reivindicación 13, Fig 15); documento US6153408 (Col 35-38); documento US5976551 (col 168-170); documento US6011146 (col 145-146); Kasahara *et al.*, (1989) *Immunogenetics* 30(1):66-68; Larhammar *et al.*, (1985) *J. Biol. Chem.* 260(26):14111-14119
- 15 (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 detrusor) SECUENCIA DE PROTEÍNAS completa mgqgagck...lephrst (1..422; 422 aa), pl: 7,63, PM: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 17p13.3, Nº de registro en Genbank NP\_002552.2); Le *et al.*, (1997) *FEBS Lett.* 418(1-2):199 - 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);
- 20 (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de las células B CD72, Lyb-2); SECUENCIA DE PROTEÍNAS completa maeaiy...tafrfpd (1..359; 359 aa), pl: 8,66, PM: 40225 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 9p13.3, Nº de registro en Genbank NP\_001773.1); documento WO2004042346 (Reivindicación 65); documento WO2003/026493 (Páginas 51-52, 57-58); documento WO2000/75655 (Páginas 105-106); Von Hoegen *et al.*, (1990) *J. Immunol.* 144(12):4870-4877; Strausberg *et al.*, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:16899-16903.
- 25 (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 registro en Genbank NP\_005573.1); documento US2002/193567; documento WO97/07198 (Reivindicación 11, Páginas 39-42); Miura *et al.*, (1996) *Genomics* 38(3):299-304; Miura *et al.*, (1998) *Blood* 92:2815-2822; documento WO2003/083047; documento WO97/44452 (Reivindicación 8, Páginas 57-61); documento WO2000/12130 (Páginas 24-26);
- 30 (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 registro Genbank NP\_443170.1); WO2003/077836; documento WO2001/38490 (Reivindicación 6, Fig. 18E-1-18-E-2); Davis *et al.*, (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98(17):9772-9777; documento WO2003/089624 (Reivindicación 8); documento EP1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003/089624 (Reivindicación 7);
- 35 (35) IRTA2 (receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas asociado con la translocación, un inmunorreceptor 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 Registro 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);
- 40 Para otra divulgación concerniente a los antígenos asociados a tumor y antígenos específicos, véase también: documento WO04/045516 (03 de junio de 2004); documento WO03/000113 (03 de enero de 2003); documento
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

WO02/016429 (28 de febrero de 2002); documento WO02/16581 (28 de febrero de 2002); documento WO03/024392 (27 de marzo de 2003); documento WO04/016225 (26 de febrero de 2004); documento WO01/40309 (07 de junio de 2001), y la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° de serie 60/520842 "COMPOSITION AND METHODS FOR THE TREATMENT OF TUMOR OF HEMATOPOIETIC ORIGIN", presentada el 17 de noviembre de 2003.

Otros anticuerpos de ejemplo y sus abreviaturas incluyen: Herceptin® (trastuzumab) = antiHER2 humanizado de longitud completa (PM 145167), Herceptin F(ab')<sub>2</sub> = derivado de antiHER2 enzimáticamente (PM 100000), 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.

El anticuerpo de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) para su uso en la invención 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).

El anticuerpo del ADC puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado puede ser huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 o de huMAb4D5-8 (trastuzumab). El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab.

Los anticuerpos conocidos para el tratamiento o prevención del cáncer se pueden conjugar como ADC. Los anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de célula de cáncer se pueden obtener comercialmente o producir mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica, tal como, por ejemplo, técnicas de expresión recombinante. La secuencia nucleotídica que codifican anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de célula cancerosa se pueden obtener de, por ejemplo, la base de datos GenBank de una base de datos como esa, una fuente comercial o de otro tipo, publicaciones bibliográficas o clonación y secuenciación de rutina. Los ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales anti-HER2 humanizados para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; RITUXAN® (rituximab; Genentech) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin; OvaRex (AltaRex Corporation, MA), que es un anticuerpo murino para el tratamiento del cáncer de ovarios; Panorex (Glaxo Wellcome, NC), que es un anticuerpo IgG<sub>2a</sub> murino para el tratamiento del cáncer colorrectal; Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc. , NY) que es un anticuerpo quimérico IgG anti-EGFR para el tratamiento de los cánceres positivos para el factor de crecimiento epidérmico, tal como el cáncer de cabeza y cuello; Vitaxin (MedImmune, Inc. , MD) que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del sarcoma; Campath I/H (LeukoSite, MA) que es un anticuerpo IgG<sub>1</sub> humanizado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc. , CA) que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA); LymphoCide (Immunomedics, Inc. , NJ) que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado para el tratamiento deL linfoma no Hodgkin; Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc. , CA) que es un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; Oncolym (Techniclone, Inc. , CA) que es un anticuerpo anti-HLA-DR10 murino radiomarcado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; Allomune (BioTransplant, CA) que es un MAb anti-CD2 humanizado para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o linfoma no Hodgkin; Avastin (Genentech, Inc. , CA) que es un anticuerpo humanizado anti-VEGF para el tratamiento del cáncer de pulmón y colorrectal; Epratuzamab (Immunomedics, Inc. , NJ y Amgen, CA) que es un anticuerpo anti-CD22 para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; y CEAcide (Immunomedics, NJ) que es un anticuerpo anti-CEA humanizado para el tratamiento del cáncer colorrectal.

#### ANTICUERPOS MARCADOS

Los anticuerpos para su uso en la invención pueden conjugarse con cualquier resto marcador que se puede unirse covalentemente al anticuerpo a través de un grupo funcional reactivo, tal como un tiol de cisteína o amino de lisina (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E. y Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2ª ed. CRC Press, Boca Raton, FL). El marcador unido puede funcionar 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.

Los anticuerpos marcados se pueden usar también como un agente de purificación por afinidad. En este proceso, el anticuerpo marcado se inmoviliza sobre una fase sólida, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno a purificar, y, posteriormente, el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto el antígeno a purificar, que está unido a la variante de polipéptido inmovilizado. Por último, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, a pH 5,0, que liberará el antígeno de la variante polipeptídica.

La variante polipeptídica también puede ser útil en ensayos diagnósticos, por ejemplo para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o suero específicos.

Para aplicaciones diagnósticas, el anticuerpo normalmente se marcará con un resto detectable. Existen numerosos marcadores que generalmente se pueden agrupar en las categorías siguientes:

(a) Radioisótopos, tales como  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , y  $^{131}\text{I}$ . El anticuerpo puede marcarse con reactivos que incluyen un radioisótopo o que pueden formar un complejo con un radioisótopo en el que el reactivo puede reaccionar con el tiol de cisteína modificada del anticuerpo, usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs (1991).

(b) Los marcadores fluorescentes, tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y rojo Texas se encuentran disponibles. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse con la variante de polipéptido usando las técnicas divulgadas en *Current Protocols in Immunology*, citado anteriormente, por ejemplo, y reactivos marcadores fluorescentes de Molecular Probes (Eugene, OR).

(c) Reactivos quelantes, tales como DOTA o éteres corona que pueden formar complejos con iones metálicos (documento US 2002/0006379).

(d) Varios marcadores de enzima-sustrato existen o se divulgan (documento US 4275149). La enzima generalmente cataliza una alteración química del 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. Anteriormente se han descrito técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y después puede emitir luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de EE.UU. N° 4737456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP),  $\beta$ -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 el que la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor del pigmento (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o 3,3',5',5'-tetrametilbencidina clorhidrato (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y

(iii)  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa.

Otras numerosas combinaciones de enzima-sustrato se encuentran disponibles para los expertos en la técnica. Para una revisión general de estas véanse las patentes de EE.UU. N° 4.275.149 y 4.318.980.

En ocasiones, el marcador está conjugado indirectamente con la variante de polipéptido. El experto conocerá varias técnicas para conseguirlo. Por ejemplo, la variante de polipéptido puede conjugarse con biotina y cualquiera de las categorías de marcadores mencionados anteriormente puede conjugarse con avidina 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. Como alternativa, para conseguir la conjugación indirecta del marcador con la variante de polipéptido, la variante de polipéptido se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con una variante de polipéptido anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta del marcador con la variante de polipéptido (Hermanson, G. (1996) in *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego).

La variante de polipéptido también se puede emplear en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158, CRC press, Inc.).

- 5 La variante de polipéptido también se puede usar para ensayos diagnósticos *in vivo*. Generalmente, la variante de polipéptido está marcada con un radionúclido (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ ) de modo que el antígeno o las células que lo expresan se pueden localizar utilizando inmunoescintografía.

10 Un marcador de detección puede ser útil para localizar, visualizar y cuantificar un acontecimiento de unión o reconocimiento. Los anticuerpos marcados de la invención pueden detectar receptores de superficie celular. Otro uso para los anticuerpos marcados de forma detectable es un método de inmunocaptura basado en perlas que comprende la conjugación de una perla con un anticuerpo marcado fluorescente y la detección de una señal de fluorescencia tras la unión de un ligando. Metodologías de detección de unión similares utilizan el efecto de resonancia de plasmón superficial (SPR) para medir y detectar las interacciones anticuerpo-antígeno.

15 Los marcadores de detección que son generalmente aplicables para la tinción o marcaje de anticuerpos pueden tener las siguientes propiedades: (i) el anticuerpo marcado debe producir una señal alta con un bajo fondo de modo que pequeñas cantidades de biopolímeros se pueden detectar con sensibilidad en ensayos tanto sin células como basados en células y (iii) el anticuerpo marcado deberá ser fotoestable, de modo que la señal fluorescente se puede observar, monitorizar y registrar sin que se produzca un fotoblanqueo significativo. Para aplicaciones que implican la unión en la superficie celular de anticuerpos marcados a membranas o superficies de las células, especialmente células vivas, los marcadores preferentemente (iii) tienen una buena solubilidad en agua para alcanzar la concentración de conjugado eficaz y sensibilidad de detección y (iv) no son tóxicos para las células vivas porque no interrumpen los procesos metabólicos normales de las células ni causan la muerte celular prematura. Los restos de marcadores que proporcionan una señal detectable incluyen pigmentos fluorescentes, pigmentos quimioluminiscentes (Briggs et al, "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058 (1997).

20 Los Métodos de marcaje de péptidos son bien conocidos. Véase Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, "Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach", Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer et al (1975) "Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology" (T. S. Work y E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. y Noyes, C. M. (1984) "Chemical Reagents for Protein Modification", Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfeleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins, en *Modern Methods in Protein Chemistry*", H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York; y Wong (1991) "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking", CRC Press, Boca Raton, Fla.).

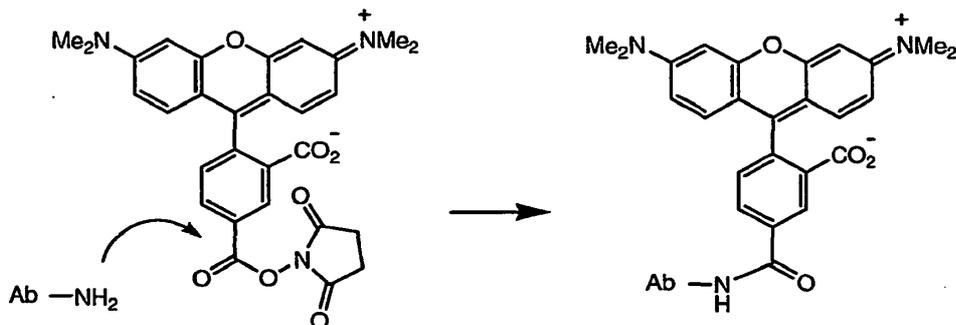
30 Los péptidos marcados con dos restos, un indicador fluorescente e inactivador con suficiente proximidad se someten a transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Los grupos indicadores normalmente son pigmentos fluorescentes que son excitados por la luz a una determinada longitud de onda y transfieren energía a un aceptor, o inactivador, grupo, con el desplazamiento de Stokes adecuado para la emisión a un brillo máximo. Los pigmentos fluorescentes incluyen moléculas con aromaticidad extendida, tales como fluoresceína y rodamina, y sus derivados. El indicador fluorescente puede inactivarse parcial o significativamente mediante el resto atenuador en un péptido intacto. Tras la escisión del péptido por una peptidasa o proteasa, se puede medir un aumento detectable de la fluorescencia (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34).

35 Los reactivos de marcaje normalmente son portadores de una funcionalidad reactiva que puede reaccionar (i) directamente con un grupo funcional reactivo, por ejemplo, tiol de cisteína, de un anticuerpo para formar el anticuerpo marcado, (ii) con un reactivo enlazador para formar un marcador enlazador intermedio, o (iii) con un anticuerpo enlazador para formar el anticuerpo marcado. La funcionalidad reactiva de los reactivos de marcaje incluyen: maleimida, haloacetilo, éster de succinimidilo yodoacetamida (por ejemplo, NHS, N-hidroxisuccinimida), isotiocianato, cloruro de sulfonilo, 2,6-diclorotriazinilo, éster de pentafluorofenilo y fosforamidita, aunque también se pueden utilizar otros grupos funcionales.

40 Un grupo funcional reactivo de ejemplo es éster de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) de un grupo carboxilo sustituyente de un marcador detectable, por ejemplo, biotina o un pigmento fluorescente. El éster de NHS del marcador puede preformarse, aislarse, purificarse y/o caracterizarse, o puede formarse *in situ* y hacerse reaccionar con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Normalmente, la forma carboxilo del marcador se activa mediante la reacción con alguna combinación de un reactivo carbodiimida, por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, o un reactivo de uronio, por ejemplo, TSTU tetrafluoroborato (O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, HBTU hexafluorofosfato de (O-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio) o HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), un activador, tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y N-hidroxisuccinimida para dar el éster de NHS del marcador. En algunos casos, el marcador y el anticuerpo se pueden acoplar mediante activación *in situ* del marcador y la reacción con el anticuerpo para formar el conjugado anticuerpo-

marcador en una etapa. Otros reactivos de activación y acoplamiento incluyen TBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazo-1-il)-1,3,3-tetrametiluronio), TFFH (N,N',N'',N'''-tetrametiluronio-2-fluoro-hexafluorofosfato), (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio, EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina) PyBOP, DCC (diciclohexilcarbodiimida); DIPCDI (diisopropilcarbodiimida), MSNT (1-(mesitileno-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol, y haluros de sulfonilarilo, por ejemplo, cloruro de triisopropilbencenosulfonilo.

Un anticuerpo de ejemplo y la conjugación con un pigmento de tetrametilrodamina (TAMRA) fluorescente se muestra como:



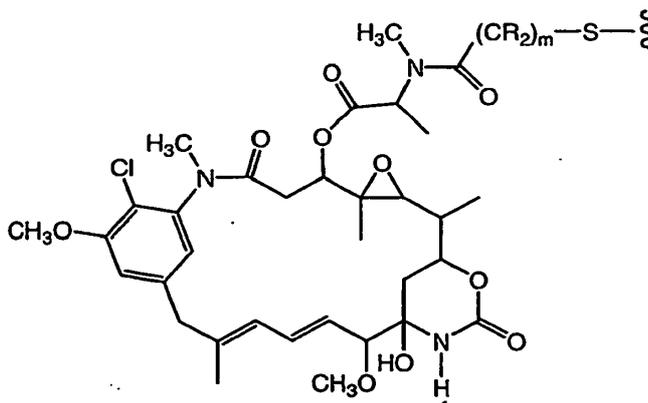
Como se muestra, uno o más grupos amino reactivos, por ejemplo, lisina, de un anticuerpo desplaza el grupo hidroxisuccinimida de un éster activo de NHS de un pigmento fluorescente, tal como TAMRA, lo que tiene como resultado en la conjugación de uno o más restos de pigmento TAMRA al anticuerpo. Ciertos pigmento fluorescentes en proximidad a otros pigmentos fluorescentes pueden sufrir inactivación. Se observan efectos de autoinactivación en la que el brillo (coeficiente de extinción molecular) tal como se mide por fluorescencia o absorbancia UV no se correlaciona linealmente con el número de restos de pigmento en la molécula. La Figura 8 muestra un espectro de desconvolución del conjugado trastuzumab-rodamina después de desglucosilación. La Figura 9 muestra los iones cargados (m/z) antes de la desconvolución de los espectros del conjugado de rodamina trastuzumab después de la desglucosilación de la figura 8, que se utilizan para la cuantificación. Los métodos de separación, detección y cuantificación de la invención pueden caracterizar la carga de pigmento y la distribución del producto (Figura 39), mientras que la espectroscopia de fluorescencia o UV no puede.

#### 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. 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.

Restos de fármaco de ejemplo D en el conjugado anticuerpo-fármaco de fórmula I son fármacos citotóxicos, en particular los que se usan para la terapia del cáncer. Dichos fármacos incluyen, en general, agentes que dañan el ADN, antimetabolitos, productos naturales y sus análogos. Clases de ejemplo de agentes citotóxicos incluyen los inhibidores de enzimas, tales como inhibidores de la dihidrofolato reductasa e inhibidores de la timidilato sintasa, intercaladores de ADN, fragmentadores de ADN, inhibidores de la topoisomerasa, la familia antraciclina de fármacos, los fármacos de vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, la familia de fármacos de la pteridina, dienos, podofilotoxinas, dolastatinas, maitansinoides, inductores de la diferenciación, y taxoles. Restos de fármaco de ejemplo incluyen, entre otros: metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, arabinósido de citosina, melfalán, leurosina, leurosideína, actinomocina, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C, mitomicina A, carminomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina y derivados de podofilotoxina tales como etopósido o fosfato de etopósido, vinblastina, vincristina, vindesina, taxol, taxotere ácido retinoico, ácido butírico, N<sup>8</sup>-acetil espermidina, camptotecina, caliqueamicina, esperamicina, eno-diinos, y sus derivados y análogos.

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



5 en la que 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 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. La cadena de alqueno que une el grupo amida al átomo de azufre puede ser metanilo, etanilo, o propilo, es decir, m es 1,2 o 3.

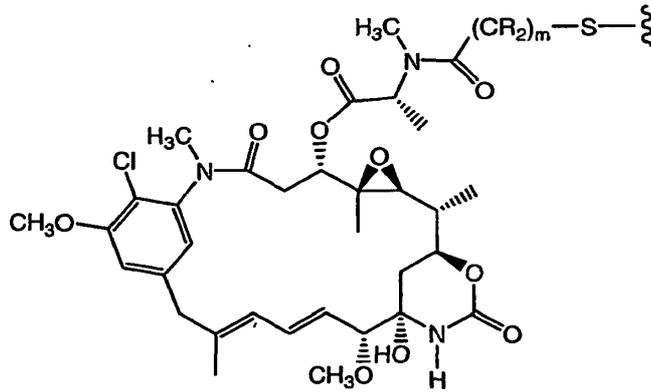
10 Los compuestos de maitansina inhiben la proliferación celular mediante la inhibición de la formación de microtúbulos durante la mitosis a través de la inhibición de la polimerización de la proteína microtubular, tubulina (Remillard et al (1975) Science 189:1002 - -1005; documento US 5208020). La maitansina 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., (1984) Chem. Pharm. Bull. 32:3441-3451). 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, decloro) 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:

- 20 (a) ésteres C-3 con ácidos carboxílicos simples (patentes de EE.UU. Nº 4248870; 4265814; 4308268; 4308269; 4309428; 4317821; 4322348; and 4331598), y  
 (b) ésteres C-3 con derivados de N-metil-L-alanina (patentes de EE.UU. Nº 4137230 y 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).

25 La maitansina y los maitansinoides son altamente citotóxicos pero su uso clínico en la terapia del cáncer está limitado en gran medida por sus graves efectos secundarios sistémicos atribuidos principalmente a su escasa selectividad para los tumores. Los ensayos clínicos con maitansina se habían interrumpido debido a los efectos adversos graves en el sistema nervioso central y el sistema gastrointestinal (Issel et al, (1978) Can. Treatment. Rev. 5:199-207).

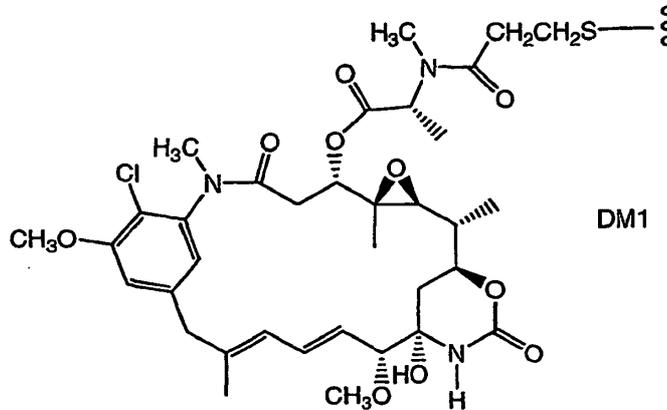
30 Los restos de fármaco maitansinoide son restos de fármaco atractivos en los conjugados de anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar mediante fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de enlazadores no disulfuros a anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra varias líneas de células tumorales.

35 Como ocurre con otros restos de fármaco, todos los estereoisómeros del resto de fármaco maitansinoide se contemplan para los compuestos de la invención, 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:

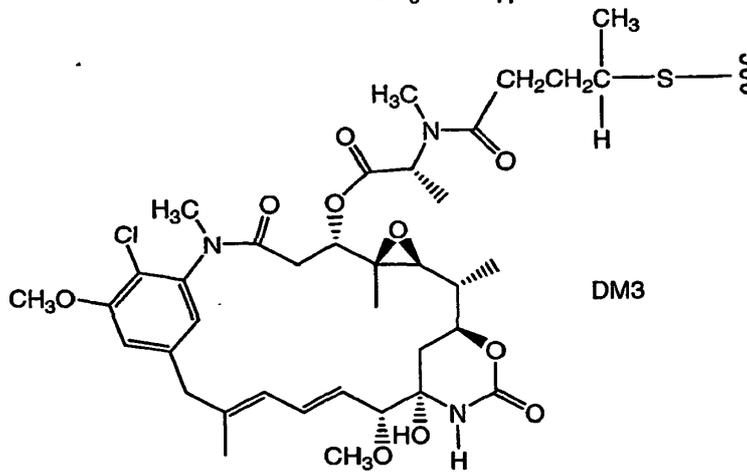


Ejemplos de realización de restos de fármaco de maitansinoide incluyen: DM1,  $(CR_2)_m = CH_2CH_2$ ; DM3,  $(CR_2)_m = CH_2CH_2CH(CH_3)$ ; y DM4,  $(CR_2)_m = CH_2CH_2C(CH_3)_2$ , que tienen las estructuras:

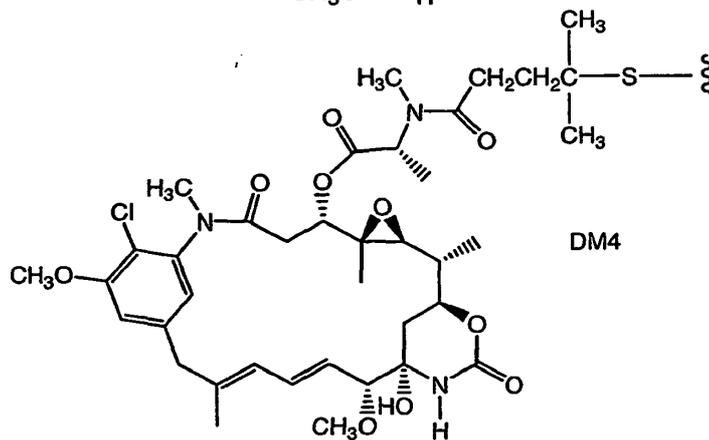
5



DM1



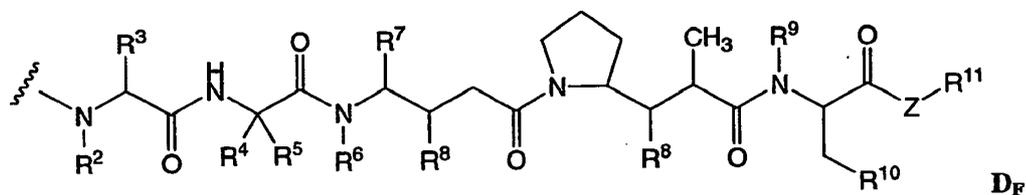
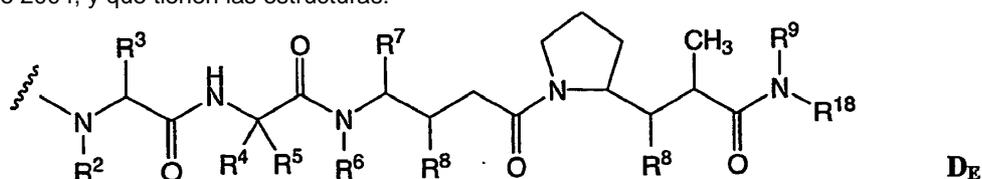
DM3



DM4

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). El resto de fármaco de dolastatina o auristatina se puede unir al anticuerpo a través del extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172). Las variantes de auristatina E se divulgan en los documentos US 5767237; US 6124431.

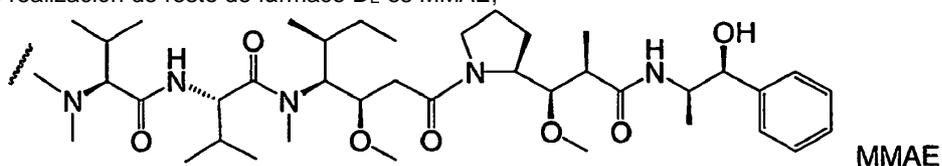
10 Las realizaciones del resto de fármaco (D) de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I incluyen los restos de fármaco de monometilauristatina unidos al extremo N D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub>, divulgados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento de EE.UU. N° de serie 10/983,340, presentado el 5 de noviembre de 2004, y que tienen las estructuras:



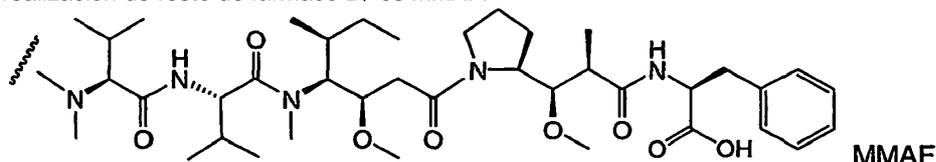
15 en las que la línea ondulada de D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub> indica el sitio de unión covalente a A, W o Y del enlazador y de forma independiente en cada localización:

- 20 R<sup>2</sup> se selecciona de H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>3</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>), alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
 R<sup>4</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, alil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>), alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
 R<sup>5</sup> se selecciona de H y metilo;  
 25 o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en el que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6;  
 R<sup>6</sup> se selecciona de H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>7</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>), alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
 30 cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O- (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);  
 R<sup>9</sup> se selecciona de H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>10</sup> se selecciona de arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> o heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>;  
 Z es O, S, NH, o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>11</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>, o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;  
 35 m es un número entero que varía de 1-1000;  
 R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>14</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 40 cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH;  
 R<sup>18</sup> se selecciona de -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>), -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) y -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); y  
 n es un número entero que varía de 0 a 6.

45 Un ejemplo de realización de resto de fármaco D<sub>E</sub> es MMAE;



Un ejemplo de realización de resto de fármaco D<sub>F</sub> es MMAF:



5 Los inmunocombinados de MMAE y MMAF se divulgan en Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presentado el 28 de marzo de 2004.

Normalmente, restos de fármacos basados en péptidos se pueden preparar mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármaco auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: documento US 5635483; documento US 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863.

15 Otra clase útil de resto de fármaco para los compuestos de Fórmula I es la familia de eno-diino de caliqueamicinas (documentos US5053394, US4970198, US5079233, US5773001, US5606040, US5739116, US5264586, US5384412) y esperamicinas (documento US5877296).

## 20 ENLAZADORES

Un enlazador (L) es un resto bifuncional o multifuncional que se puede usar para unir uno o más restos de fármaco (D) y una unidad de anticuerpo (Ab) para formar combinados de anticuerpo-fármaco (ADC) de fórmula I. Los combinados anticuerpo-fármaco (ADC) se pueden preparar de forma conveniente usando un enlazador que tiene funcionalidad reactiva para la unión al fármaco y al anticuerpo. Varios grupos funcionales de un anticuerpo (Ab), incluyendo un tiol de cisteína, un amino de lisina, un ácido carboxílico de ácido aspártico, o un grupo hidroxilo de azúcar, pueden formar un enlace con un grupo funcional de un resto de fármaco o reactivo de fármaco-enlazador.

En un aspecto, un enlazador tiene un grupo electrófilo que es reactivo con un grupo nucleófilo, tal como cisteína, presente en un anticuerpo. Por ejemplo, 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 tioles de cisteína de anticuerpos pueden reaccionar con grupos funcionales electrofílicos tales como maleimida o  $\alpha$ -halo carbonilo, de resto de fármaco-enlazadores o reactivos enlazadores, de acuerdo con el método de conjugación en la página 766 de Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773, y de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 4.

En una realización, el enlazador L de un ADC tiene la fórmula:



40 en la que:

A es una unidad de extensora unida covalentemente a un tiol de cisteína del anticuerpo (Ab);

a es 0 o 1;

45 cada W es independientemente una unidad de aminoácido;

w es independientemente un número entero que varía de 0 a 12;

Y es una unidad espaciadora unida covalentemente al resto de fármaco; y

y es 0, 1 o 2.

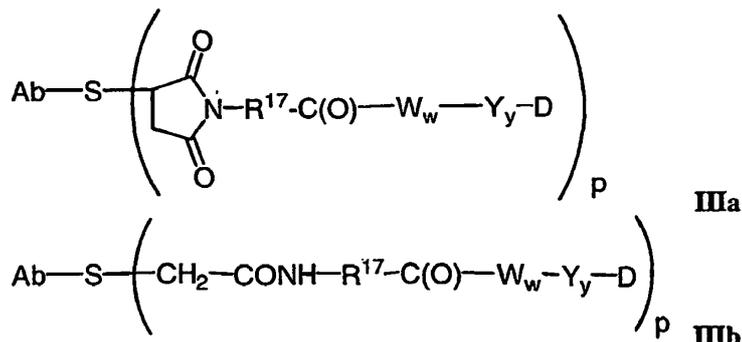
50 Las realizaciones de ejemplo incluyen, cuando D es una unidad de fármaco (resto) que tiene un átomo de nitrógeno que puede formar un enlace con la unidad espaciadora cuando y es 1 o 2, con el grupo carboxilo en C-terminal de una unidad de aminoácido cuando y es 0, con el grupo carboxilo de una unidad extensora cuando w e y son cada uno 0, y con el grupo carboxilo de una unidad de fármaco cuando a, w, e y son cada uno 0. Cabe entender que las expresiones "unidad de fármaco" y "resto de fármaco" son sinónimos y se usan indistintamente en el presente documento.

### Unidad extensora

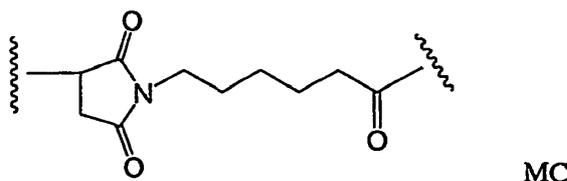
60 La Unidad extensora (A), cuando está presente, puede unir a una unidad de anticuerpo a una unidad de aminoácido (W). En este sentido, un anticuerpo (Ab) tiene un grupo tiol de cisteína libre que puede formar un enlace con un

grupo funcional electrófilo de una Unidad extensora. Unidades extensoras representativas de esta realización se representan dentro de los corchetes de las Fórmulas **IIIa** y **IIIb**, en las que Ab, W, Y, D, w e y son como se ha definido anteriormente, y R<sup>17</sup> es un radical divalente seleccionado de (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, arilo, aril-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, -aril-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), (carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), -(heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>, y -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>; en las que r es independientemente un número entero que varía de 1 a 10.

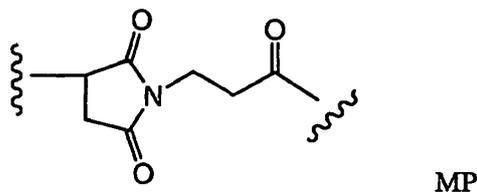
10 Cabe entender que a partir de todas las formas de realización de ejemplo de ADC de Fórmula I tales como **III-VI**, que aun cuando no denotado expresamente, de 1 a 4 restos de fármaco están unidos a un anticuerpo (p = 1-4).



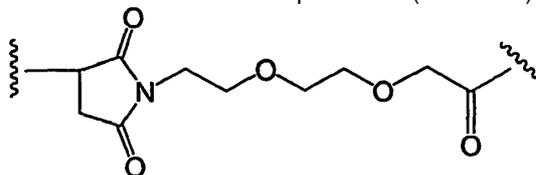
15 Una unidad extensora ilustrativa es la de la fórmula **IIIa** y deriva de maleimido-caproílo (MC) en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:



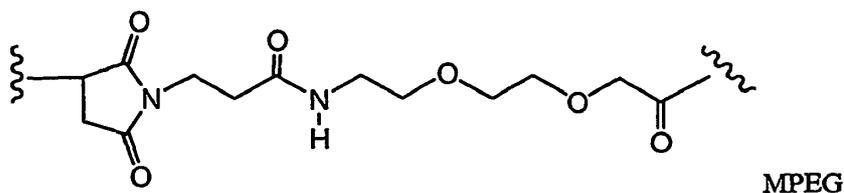
20 Una unidad extensora ilustrativa es la de la fórmula **IIIa** y deriva de maleimido-propanoílo (MP) en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-:



Otra unidad extensora ilustrativa es la de Fórmula **IIIa** en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub> - y r es 2:

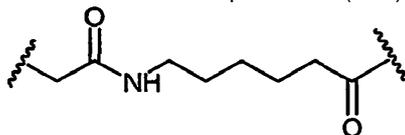


25 Otra unidad extensora ilustrativa es la de Fórmula **IIIa** en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>- en la que R<sup>b</sup> es H y cada r es 2:

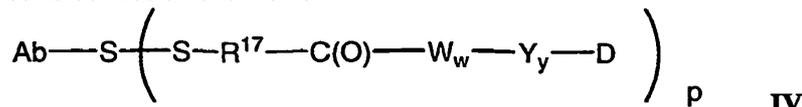


30

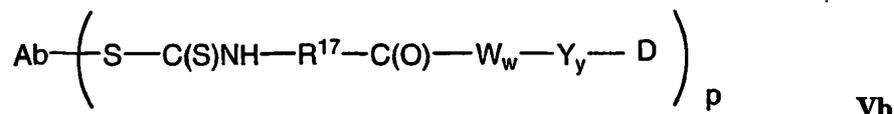
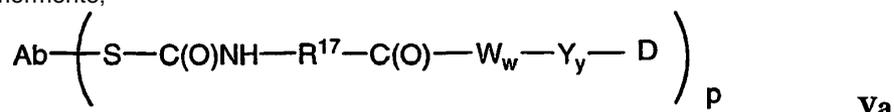
Otra unidad extensora ilustrativa es la de fórmula **IIIb** en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>:



- 5 En otra realización, la unidad extensora está unida a la unidad de anticuerpo mediante un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de anticuerpo y un átomo de azufre de la unidad extensora. Una unidad extensora representativa de esta realización se representa dentro de los corchetes de la fórmula **IV**, en la que R<sup>17</sup>, Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se ha definido anteriormente.

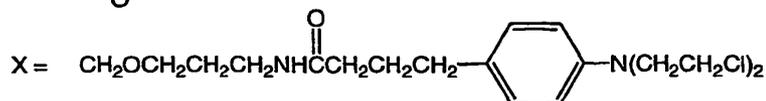
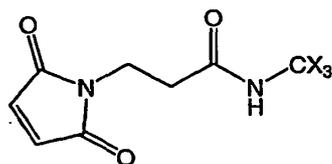


- 10 En aún otra realización, el grupo reactivo de la extensora contiene un grupo funcional reactivo con tiol que puede formar un enlace con un tiol de cisteína libre de un anticuerpo. Ejemplos de grupos funcionales reactivos con tiol incluyen, pero no se limitan a, maleimida, α-haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Unidades extensoras representativas de esta realización se representan dentro de los corchetes de las Fórmulas Va y Vb, en las que -R<sup>17</sup>-, Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se ha definido anteriormente;

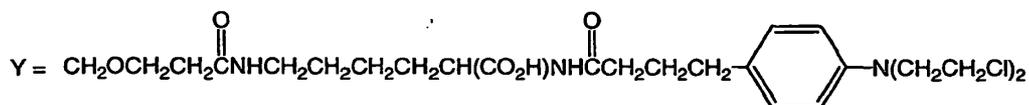
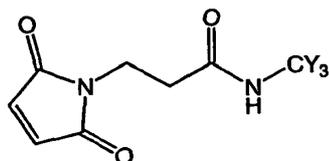


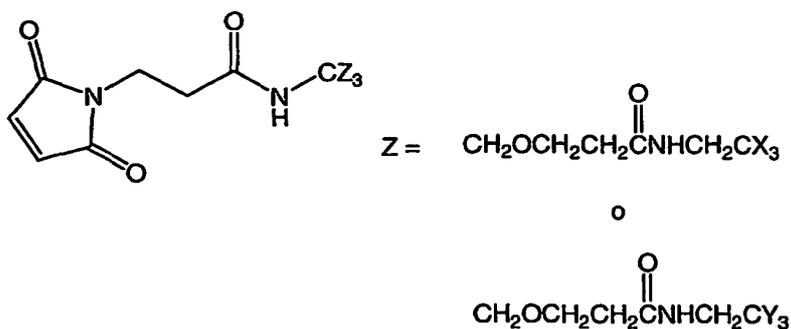
- 20 En otra realización, el enlazador puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto de fármaco a través de una ramificación, resto enlazador multifuncional a un anticuerpo (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la relación molar entre el fármaco y el anticuerpo, es decir, la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. Por tanto, cuando un anticuerpo lleva un solo grupo tiol de cisteína reactiva, una multitud de restos de fármaco puede estar unida a través de un enlazador dendrítico.

25 Las siguientes realizaciones de ejemplo de reactivos enlazadores dendríticos permiten que hasta nueve reactivos de restos de fármaco nucleófilos se conjuguen mediante la reacción con los grupos funcionales de cloroetil mostaza de nitrógeno:



30

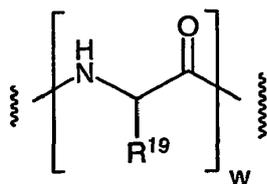




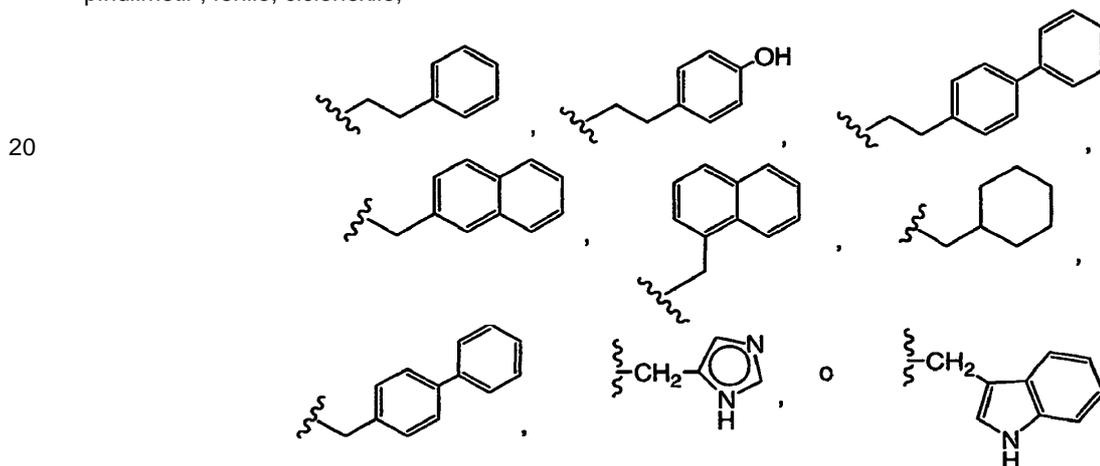
Unidad de aminoácido

5 El enlazador puede comprender restos de aminoácidos. La unidad de aminoácidos (-W<sub>w</sub>-), cuando está presente, une el anticuerpo (Ab) al resto de fármaco (D) en un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención.

10 La unidad de aminoácido -W<sub>w</sub>- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapeptido, undecapéptido o dodecapeptido. Los restos de aminoácidos que comprenden la unidad de aminoácidos incluyen los que se producen de forma natural, así como aminoácidos minoritarios y análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula indicada a continuación entre corchetes, y w es un número entero que varía de 0 a 12:



15 en la que R<sup>19</sup> es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,



25 Cuando R<sup>19</sup> es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que R<sup>19</sup> se une es quiral. Cada átomo de carbono al que R<sup>19</sup> está unido de forma independiente en la (configuración S) o (R), o una mezcla racémica. Por tanto, las unidades de aminoácidos pueden ser enantioméricamente puras, racémicas, o diastereoméricas.

30 En realizaciones ejemplares, w puede ser 1, 2 o 3, para formar unidades de aminoácidos de un solo aminoácido, dipéptido, y tripéptido, respectivamente. Las unidades de aminoácido W se seleccionan de aminoácidos de origen natural y no natural. El carbono de la cadena lateral puede estar en la configuración D o L (S o R). La unidad de aminoácido Z puede ser alanina, ácido 2-amino-2-ciclohexilacético, ácido 2-amino-2-fenilacético, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, ácido γ-aminobutírico, ácido α, -dimetil-γ-

aminobutírico, ácido  $\beta$ ,  $\beta$ -dimetil- $\gamma$  aminobutírico, ornitina, citrulina y (Cit). La unidad de aminoácido Z incluye opcionalmente formas protegidas de aminoácidos en las que la funcionalidad reactiva de las cadenas laterales están protegidas. Los reactivos de aminoácido protegidos y los intermedios son bien conocidos, incluyendo los protegidos con lisina con acetilo, formilo, trifenilmetilo (trilito), y monometoxitritilo (MMT). Otras unidades de aminoácidos protegidos incluyen un grupo tosilo o nitro protegido con arginina, protegido con ornitina on grupos acetilo o formilo.

La unidad de aminoácidos pueden escindirse enzimáticamente mediante una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada a tumor, para liberar el resto de fármaco (-D), que en una realización está protonado *in vivo* tras la liberación para proporcionar un fármaco (D). Las unidades  $-W_w$  útiles pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática por enzimas particulares, tales como catepsina B, C y D, o una proteasa plasmína.

Unidades de aminoácidos  $-W_w$  de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Entre los dipéptidos se incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Entre los tripéptidos se incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly).

#### Unidad espaciadora

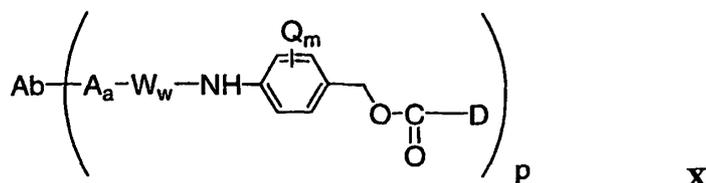
La unidad espaciadora ( $-Y_y$ ), cuando está presente ( $y = 1$  o  $2$ ), une una unidad de aminoácido ( $-W_w$ ) al resto de fármaco (D) cuando una unidad de aminoácido está presente ( $w = 1-12$ ). Como alternativa, la unidad espaciadora une la unidad extensora al resto de fármaco cuando la unidad de aminoácidos está ausente. La unidad de espaciador también une el resto de fármaco a la unidad de anticuerpo cuando tanto la unidad de aminoácido como la unidad espaciadora están ausentes ( $w, y = 0$ ). Las unidades espaciadores son de dos tipos generales: Autoinmoladoras y no autoinmoladoras. Una unidad espaciadora no autoinmoladora es una en la que parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida al resto de fármaco después de la escisión, en particular enzimática, de una unidad de aminoácido del conjugado de anticuerpo-fármaco o el resto fármaco-enlazador. Cuando un ADC que contiene una unidad espaciadora glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina sufre escisión enzimática a través de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a los linfocitos, un resto de fármaco-glicina-glicina o un resto de fármaco-glicina se escinden de  $Ab-A_a-W_w$ . En una realización se produce una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana, de modo que escinde el enlace resto de fármaco-glicina y libera el fármaco.

En otra realización,  $-Y_y$  es una unidad p-aminobencilcarbamoilo (PAB) (véanse los Esquemas 2 y 3), cuya parte de fenileno está sustituida con  $Q_m$  en la que Q es alquilo  $C_1-C_8$ , -O-(alquilo  $C_1-C_8$ ), -halógeno, - nitro o - ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4.

Formas de realización de ejemplo de una unidad de espaciadora autoinmoladora ( $-Y_y$ ) son: -Gly-Gly- ; -Gly- ; -Ala-Phe- ; -Val-Cit-.

En una realización, se proporciona un resto de fármaco-enlazador o un ADC, en el que la unidad espaciadora está ausente ( $y = 0$ ), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Como alternativa, un ADC que contiene una unidad espaciadora autoinmoladora puede liberar -D. En una realización, - Y - es un grupo PAB (para-aminobenciloxycarbonilo) que está unido a  $-W_w$  a través del átomo de nitrógeno amino del grupo PAB, y conectado directamente a -D por medio de un grupo carbonato, carbamato o éter, en el que el ADC tiene la fórmula de ejemplo X:



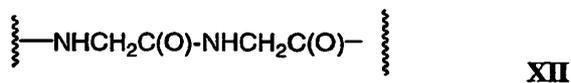
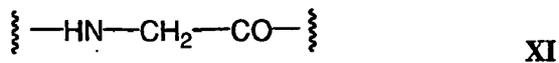
en la que Q es alquilo  $-C_1-C_8$ , -O-(alquilo  $C_1-C_8$ ), -halógeno, nitro o ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y p varía de 1 a 4.

Los espaciadores autoinmoladores incluyen, pero no se limitan a, PAB (Car1 et al (1981) J. Med. Chem. 24:479-480; Chakravarty et al (1983) J. Med. Chem. 26:638-644; documento US 6214345), compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB tales como los derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales. Se pueden usar espaciadores que sufran ciclación tras la hidrólisis del grupo amida, tal como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas o no sustituidas (Rodríguez et al, (1995) Chemistry Biology, 2:223), sistemas de anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] adecuadamente sustituidos (Storm, et al, (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al, (1990) J. Org. Chem., 55:5867). La eliminación de los fármacos que contienen aminas que están sustituidos en

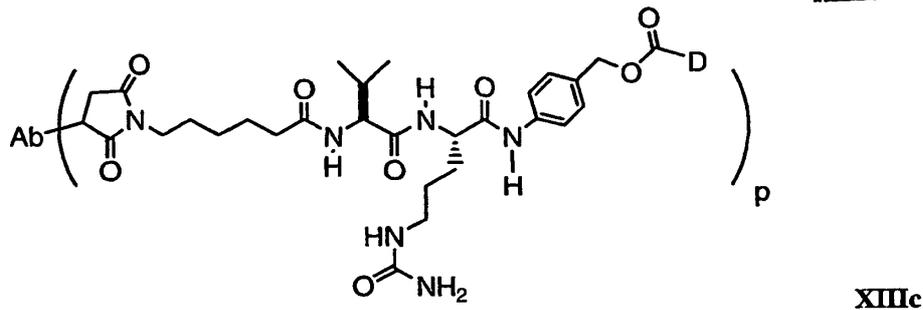
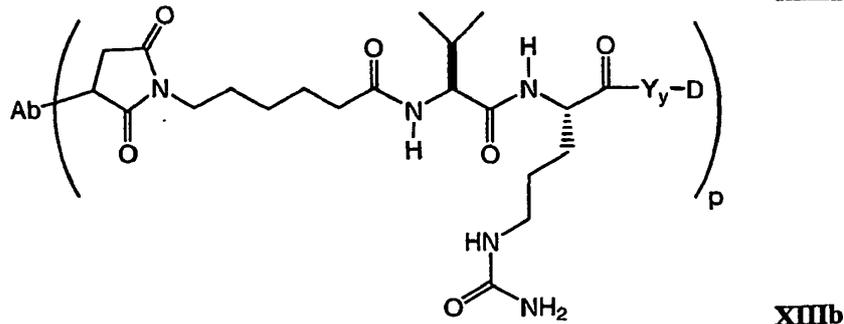
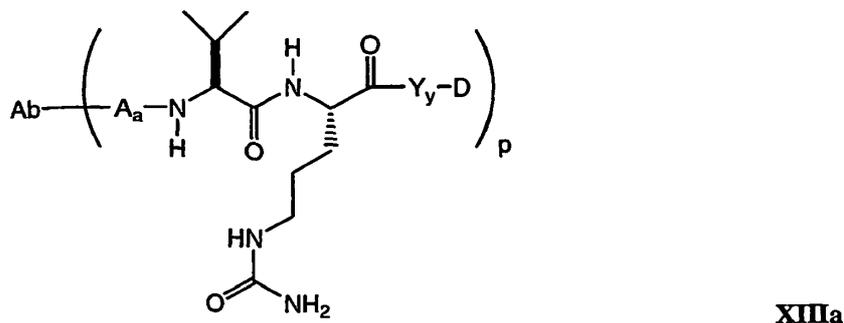
glicina (Kingsbury, et al, (1984) J. Med. Chem., 27:1447) también son ejemplos de espaciadores autoinmoladores útiles en los ADC.

Las unidades espaciadoras (-Y<sub>y</sub>-) también incluyen las representadas por las fórmulas XI y XII:

5



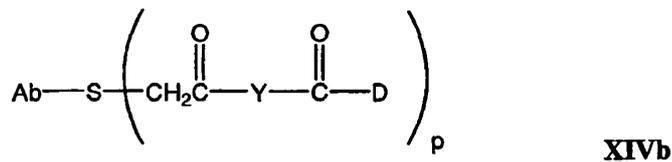
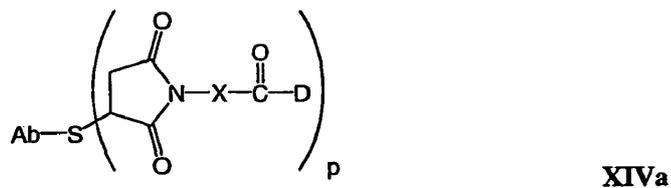
10 Las realizaciones de los compuestos conjugados anticuerpo-fármaco de fórmula I incluyen XIIIa (val-cit), XIIIb (MC-val-cit), XIIIc (MC-val-cit-PAB):



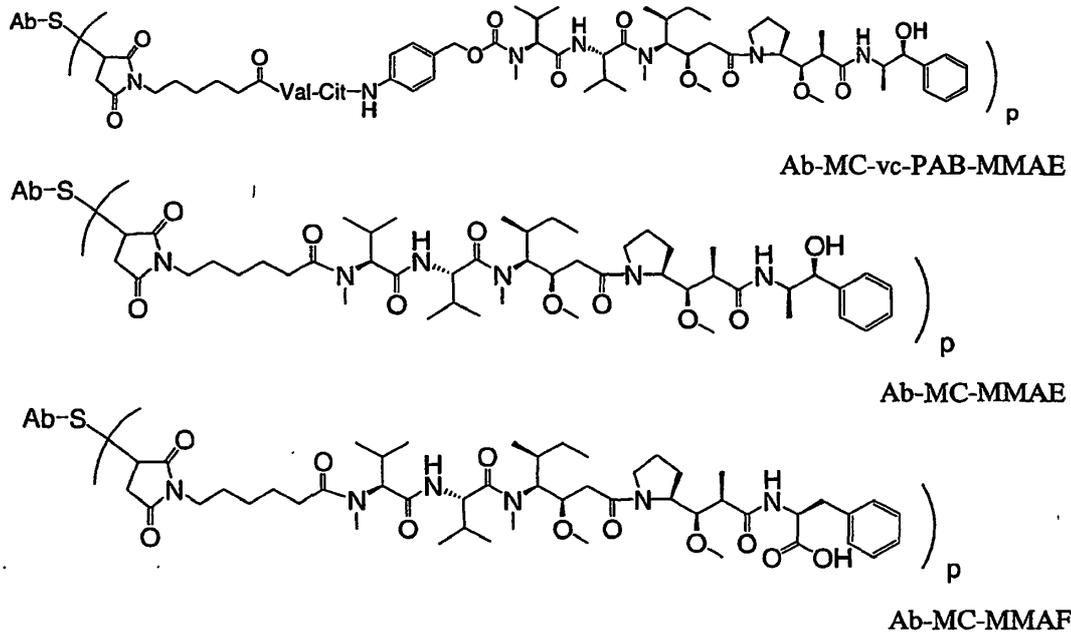
15

Otras realizaciones de ejemplo de compuestos de conjugados anticuerpo-fármaco de fórmula Ia incluyen XIVa-e:

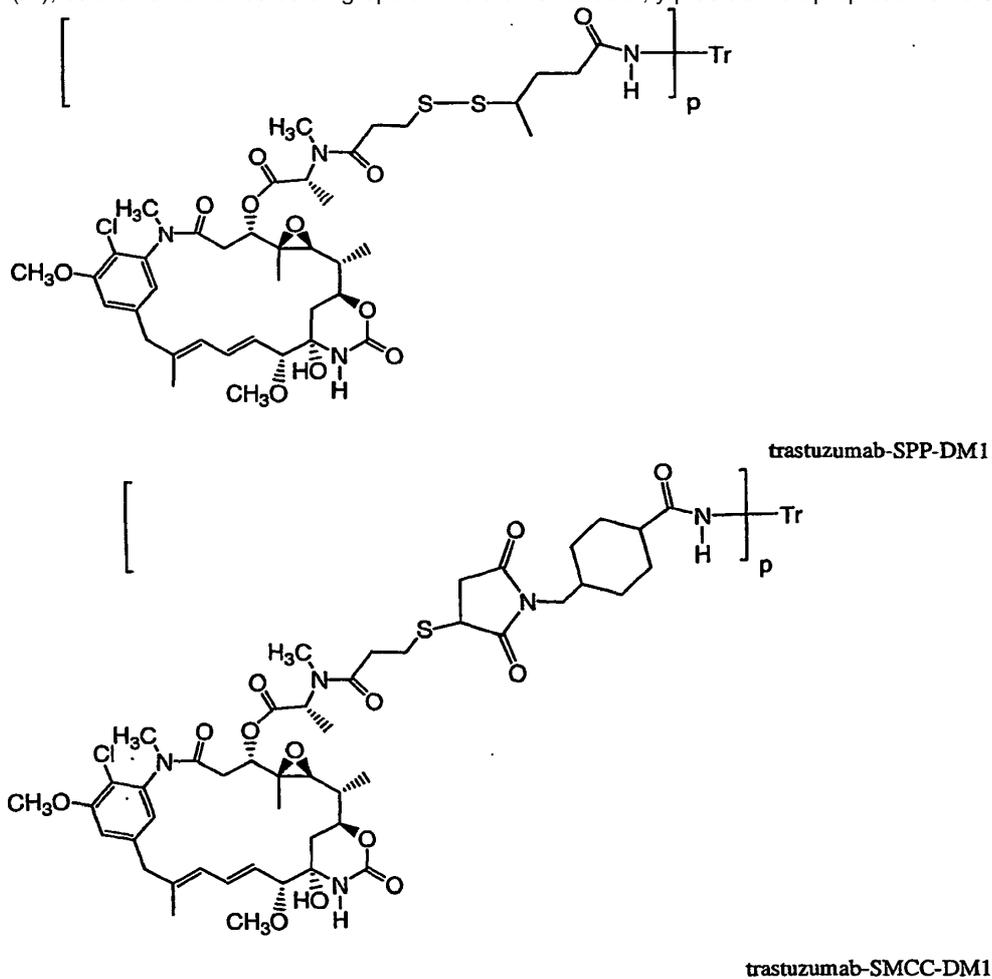
20



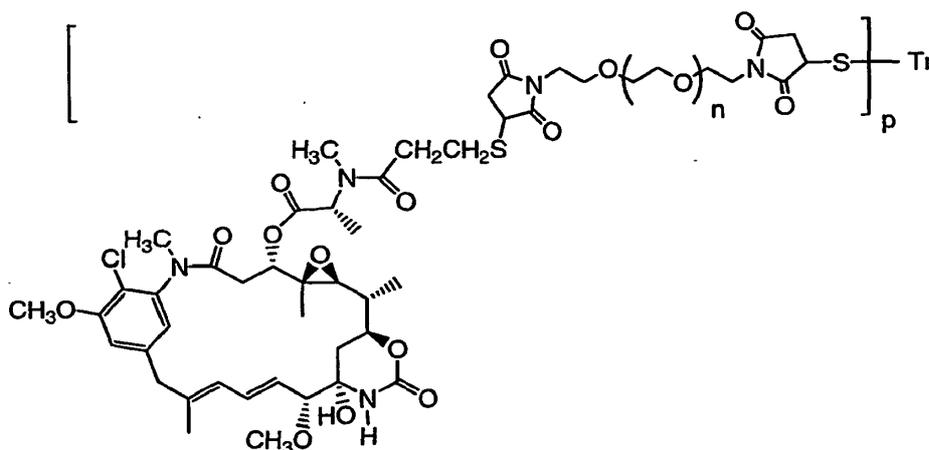




- 5 Otros conjugados de anticuerpo-fármaco de ejemplo tienen estructuras, cuando un anticuerpo, por ejemplo trastuzumab (Tr), está unido a través de un grupo amino a un enlazador, y p es de 1 a apropiadamente 8:



- 10 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 trastuzumab tienen la estructura:



en la que Tr es trastuzumab; n es 0, 1, o 2; y p es 11, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

5 Los conjugados de anticuerpo - fármaco (ADC) de Fórmula I se pueden fabricar usando los procedimientos sintéticos descritos a continuación. Los ADC se pueden preparar de forma conveniente usando un reactivo enlazador o reactivo fármaco-enlazador que tienen una funcionalidad reactiva para la unión al fármaco y al anticuerpo. En un aspecto, un reactivo enlazador tiene un grupo electrófilo que es reactivo con un grupo nucleófilo presente en un anticuerpo. Los grupos nucleofílicos útiles sobre un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleofílico de un anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en un reactivo enlazador y forma un enlace covalente con un enlazador. Los grupos electrofílicos útiles incluyen, pero no se limitan a, grupos de maleimida y de haloacetamida. El grupo electrofílico proporciona un sitio conveniente para la unión del anticuerpo.

15 En otra realización, un reactivo enlazador o reactivo de fármaco-enlazador 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 nucleófilos útiles en un enlazador incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a un enlazador.

Los grupos funcionales ácido carboxílico y los grupos funcionales cloroformiato son también sitios reactivos útiles para un enlazador, ya que pueden reaccionar con grupos amino secundarios de un fármaco para formar un enlace amida. También útil como un sitio reactivo es un grupo carbonato funcional en un enlazador, tal como, pero no limitado a carbonato de p-nitrofenilo, que puede reaccionar con un grupo amino de un fármaco, tales como, pero sin limitaciones, N-metil valina, para formar un enlace carbamato. Normalmente, los fármacos basados en péptidos se pueden preparar mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lüke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

Una unidad de anticuerpo puede formar un enlace a un enlazador, una unidad extensora, una unidad de aminoácido, una unidad espaciadora, o un resto de fármaco directamente. Una unidad de anticuerpo puede formar un enlace a una unidad enlazadora a través de un heteroátomo del anticuerpo. Los heteroátomos que pueden estar presentes en una unidad de anticuerpo incluyen, sin limitaciones, azufre (en una realización, de un grupo sulfhidrilo de un anticuerpo), oxígeno (en una realización, de un grupo carbonilo, carboxilo o hidroxilo de un anticuerpo), y nitrógeno (en una realización, de un grupo amino primario o secundario de un anticuerpo). Estos heteroátomos pueden presentar en el anticuerpo en el estado natural del anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo de origen natural, o se puede introducir en el anticuerpo mediante modificación química.

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 extensora a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.

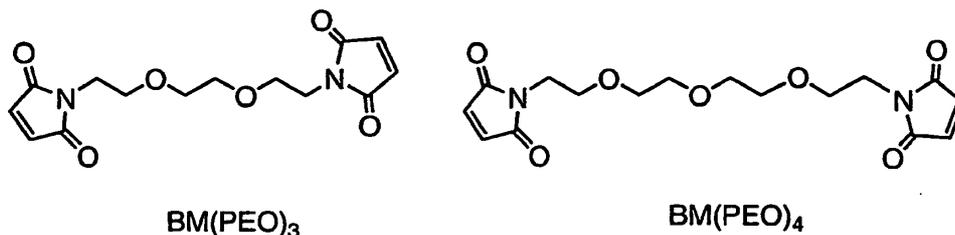
En aún otra realización, el anticuerpo puede tener uno o más grupos de hidratos de carbono que pueden oxidarse para proporcionar un grupo (-CHO) aldehído (véase, por ejemplo, Laguzza, et al (1989) J. Med. Chem. 32(3):548 -

55). El aldehído correspondiente puede formar un enlace con un sitio reactivo en un extensor. Los sitios reactivos en un extensor 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).

Normalmente, los enlazadores de tipo péptido se pueden preparar mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

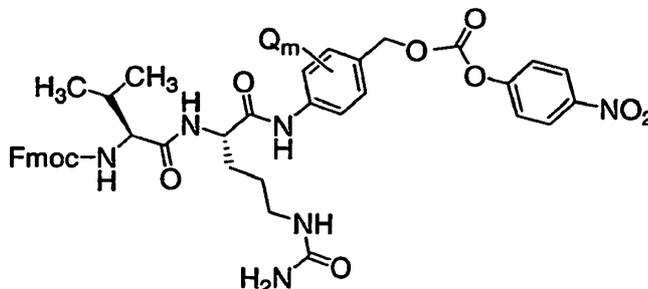
En otra realización, el enlazador puede estar sustituido por grupos que modulan la solubilidad o la reactividad. Por ejemplo, un sustituyente cargado tales como sulfonato ( $-\text{SO}_3^-$ ) O de amonio, puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo 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 (reactivo enlazador de fármacos) con Ab, dependiendo de la ruta sintética empleada para preparar el ADC.

Los compuestos de la invención 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, BMD, BMH, BMOE, BM(PEO)<sub>3</sub>, y BM(PEO)<sub>4</sub>, que están disponibles comercialmente de Pierce Biotechnology, Inc. Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 USA, 1-800-874-3723, International +815-968-0747. Véanse las páginas 467-498,2003-2004 del Applications Handbook and Catalog. Los reactivos de bis-maleimida permiten la unión del grupo tiol de un resto 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.



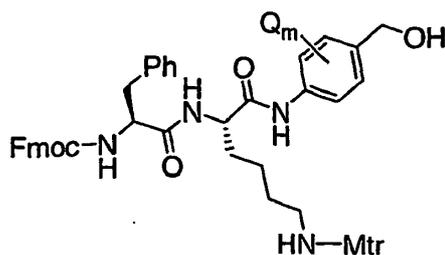
Los reactivos enlazadores útiles también se pueden obtener a través de otras fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO), o sintetizarse de acuerdo con los procedimientos descritos en Toki et al (2002) J. Org., Chem. 67:1866-1872; documento US 6214345 de Firestone et al; documento WO 02/088172; documento US 2003130189; documento US2003096743; documento WO 03/026577; documento WO 03/043583; y documento WO 04/032828.

Un reactivo enlazador dipeptídico de valina-citrulina (val-cit o vc) de ejemplo que tiene una unidad extensora maleimida y una unidad espaciadora autoinmoladota de para-aminobenciloicarbonylo (PAB) tiene la estructura:



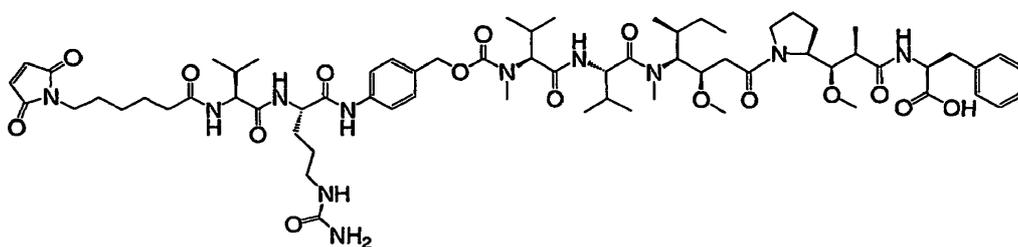
en la que Q es alquilo  $-\text{C}_1-\text{C}_8$ ,  $-\text{O}-(\text{alquilo } \text{C}_1-\text{C}_8)$ ,  $-\text{halógeno}$ , nitro o ciano y m es un número entero que varía de 0-4.

Un reactivo enlazador dipeptídico de phe-lys(Mtr) de ejemplo que tiene una unidad extensora de maleimida y una unidad espaciadora de PAB se puede preparar de acuerdo con Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60, y tiene la estructura:

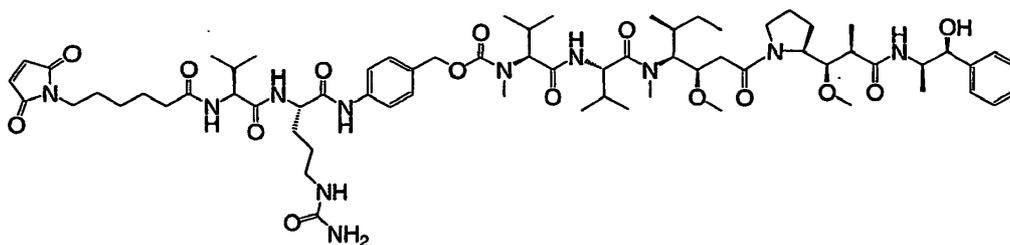


en la que Mtr es mono-4-metoxitritilo, Q es alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, nitro o ciano y m es un número entero que varía de 0-4.

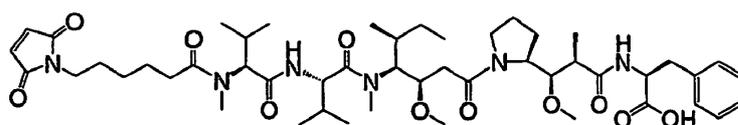
5 Ejemplos de reactivos de enlazador de fármaco incluyen: maleimidocaproil-valina-citrulina-p-hidroximetilaminobenciloxicarbonil-MMAF (MC-val-cit-PAB-MMAF):



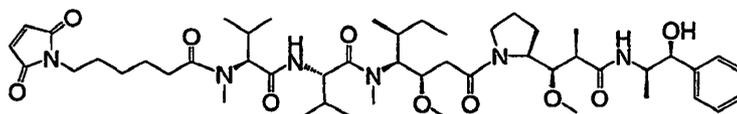
10 maleimidocaproil-valina-citrulina-p-hidroximetilaminobenciloxicarbonil-MMAE (MC-val-cit-PAB-MMAE):



15 Maleimidocaproil-MMAF (MC-MMAF):



20 y Maleimidocaproil-MMAE (MC-MMAE):



25 y se pueden preparar de acuerdo con: Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al (2003) Blood 102:1458-1465; y "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", N° de serie EE.UU. 10/983,340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

30 Los compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco se pueden sintetizar mediante la reducción de los enlaces disulfuro entre cadenas del anticuerpo, seguida de la conjugación de los fármacos de maleimida a grupos tiol de cisteína del anticuerpo reducido a través de enlaces tioéter. Como resultado, estos conjugados de anticuerpos se mantienen juntos mediante interacciones no covalentes de van der Waals y se separarán en cadenas ligeras y pesadas después de la reducción de los enlaces disulfuro, y en condiciones desnaturizantes (cromatografía de fase inversa). Los anticuerpos que se conjugan a través de grupos amino, tales como restos de lisina, no requieren reducción y escisión de los enlaces disulfuro intercatenarios.

Los conjugados de anticuerpos se caracterizaron inicialmente mediante acoplamiento de un método de HPLC de fase inversa a (columna PLRP-S 2,0 x 50 mm, 8  $\mu$ m 1000 Å) un espectrómetro de masas API 3000. La figura 15 muestra cromatogramas de: (arriba) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE; y fragmentos aislados por cromatografía después de la reducción y desnaturalización: cadena ligera, m/z = 1675 (segunda desde arriba); cadena de la luz con un MMAE, m/z = 2.251 (tercero desde arriba); y la cadena pesada, con tres MMAE, m/z = 1832 (abajo) (Kadkhodayan, M. y Mann, E. "New Strategies in Characterization and Quantitation of Antibody-targeted Drug Conjugates in Plasma using LC/LC/MS", 51st Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry, Montréal, Québec, June 8-12,2003).

## 10 CARGA DEL FÁRMACO

El valor de la carga de fármaco está representado por p, el número promedio de restos de fármacos por anticuerpo en una molécula de fórmula I. Las composiciones de ADC de fórmula I incluyen colecciones, es decir mezclas, de anticuerpos conjugados con una serie de fármacos, de 1 a aproximadamente 8. 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 mediante los métodos de la presente invención, es decir, CL/EM. El número promedio del fármaco por anticuerpo en la preparación de ADC a partir de la reacción de conjugación se puede caracterizar por los métodos de la presente invención, es decir CL/EM, e indirectamente mediante escisión por la catepsina B, seguida de ensayo ELISA para medir los niveles de fármaco libre como se indica en Sanderson et al (2005) Clinical Cancer Res. 11:843-852). Aunque ambos métodos proporcionarían un número promedio de fármaco por anticuerpo, el método CL/EM proporciona información adicional sobre la distribución de p (fármaco) por anticuerpo intacto, así como de los fragmentos de cadena ligera y pesada. 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 resolución de la etapa de medios de separación de los métodos de la invención proporciona la separación, purificación y cuantificación de los componentes individuales de la muestra de muestras de ADN complejas y heterogéneas. La alta resolución y precisión de la etapa de espectrometría de masas de los métodos de la invención proporciona la detección y cuantificación de los constituyentes de la muestra 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 unión se produce a un tiol de cisteína del anticuerpo, como en las realizaciones de ejemplo 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 que se va a conjugar, 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, falta de eficacia 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 un intermedio enlazador reactivo con amina o reactivo enlazador. Solo los grupos de lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador reactivo con amina. Asimismo, solo los grupos de cisteína tiol más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador 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) clorhidrato de o tris(2-carboxietil)fosfina (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-enlazador o el reactivo enlazador 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 enlazador con fármaco, o reactivo enlazador 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) para su uso en la invención 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.

#### FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Las formulaciones farmacéuticas de conjugados terapéuticos de fármaco-anticuerpo (ADC) para su uso en la invención 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) 16th 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.

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-hidroxibutírico.

#### METABOLITOS DE LOS CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO

En el presente documento también se divulgan 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, del compuesto administrado. De acuerdo con lo anterior, se describen compuestos nuevos y no evidentes producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de la presente invención con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico

del mismo. Los métodos también incluyen la detección y caracterización de los metabolitos de anticuerpos y conjugados de anticuerpo-fármaco que son constituyentes individuales de la muestra.

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.

Se observó un ejemplo de un metabolito tal durante el análisis de una muestra de plasma de estudios TK *in vivo* de  $\alpha$ Her2 (trastuzumab) -MC-MMAF de macaco (*Macaca fascicularis*). La Figura 41 representa una pequeña proteína (8.178 de PM) capturado y aislado por una membrana de afinidad anti-auristatina. Como muestra el perfil farmacocinético en la Figura 42, la concentración de esta proteína aumenta con el tiempo hasta que alcanza una meseta después de 10 horas y mantiene su concentración durante el estudio (5 días).

## 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*, 2ª 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 aclaran la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción (ADME) de los anticuerpos y de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC).

## PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tras la administración de la mezcla de conjugado de anticuerpo-fármaco a la fuente biológica se recoge una muestra biológica que comprende el compuesto de 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 en el presente documento 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.

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.

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.

El procesamiento de muestras biológicas para formar muestras de análisis también puede llevarse a cabo por: formulación, inmovilización, centrifugación, aislamiento, digestión, inducción o prevención de la coagulación de las células sanguíneas, hidrólisis o purificación.

La cromatografía de selección con membrana de inmovilización de (IAM) (utilizando antígeno inmovilizado) aisló de forma selectiva los conjugados anticuerpo-fármaco de plasma (Ejemplos 1, 2, 3). Las técnicas de inmovilización ofrecen una alta especificidad debido a la fuerte interacción antígeno-anticuerpo no covalente. El antígeno se inmoviliza sobre un soporte en fase sólida, se añade la muestra de la fuente biológica que contiene la proteína, las proteínas no específicas, por ejemplo, albúmina, se eliminan mediante lavado, y la proteína de interés se eluye. Los medios de selección de membrana de inmovilización de ejemplo incluyen: Resina POROS® AL-50, Monolith CIM (Convection Interactive Media®, discos epoxi de BIA Separations, Eslovenia) y membranas de afinidad EMPORE® (3M, St. Paul, MN). Se usó un instrumento PROSPEKT-2® (Chromatographic Specialties, Inc., Brockville, Ontario) para el lavado y cambio automático de la columna antes de la introducción en el espectrómetro de masas (Ejemplo 1).

La Figura 28 muestra el método de colector al vacío con múltiples pocillos de la selección con membrana de inmunofinidad (IAM) para analizar la formación de muestra mediante análisis CL/EM (Ejemplo 2). Un antígeno específico del anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco administrado se une covalentemente a una membrana en cada uno de los vasos que componen la placa de múltiples pocillos. Las muestras de plasma o suero del mamífero (fuente biológica) que recibieron la composición de conjugado anticuerpo-fármaco se aplican mediante pipeteo manual o dispensación robótica automática. Se deja que se unan los constituyentes de la muestra específicos para el antígeno de unión a la membrana. La membrana se lava para eluir las proteínas no específicas y otros constituyentes de la muestra no específicos. Los anticuerpos unidos se pueden desglucosilar sobre la membrana, 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 pipeteo 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.

En una realización de ejemplo, 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 procesar mediante métodos, que incluyen: (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.

## 20 MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y MEDIOS

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, inmunofinidad de anticuerpo/antígeno, cromatografía de inmunofinidad, inmunoadsorción 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 y de exclusión por tamaño. Los métodos electroforéticos incluyen gel unidimensional, gel fino, capilar, poli(acrilamida), desnaturalización, solución nativa, libre, papel, de 2 dimensiones, isoelectroenfoco y el voltaje de gradiente. Otros métodos de separación incluyen: diálisis, centrifugación, magnéticos, perlas magnéticas, inmunomagnetismo (documento WO 2003087772), sedimentación, flotación, precipitación, inmunoprecipitación, y filtración en gel.

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 iónica, punto isoeléctrico, 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.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco pueden desglucosilarse enzimáticamente con PNGasaF antes del análisis. Para el análisis de los conjugados tanto intactos como reducidos se usó una columna de fase inversa (PLRP-S 2.0 x 50 mm, 8µm, 4000Å) acoplada a un espectrómetro de masas API 3000 (Mann et al "A Novel Approach to Characterization of Trastuzumab-DM1 Conjugates using LC-MS for Confirmation of Statistically Calculated Distributions", 51st Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry, Montreal, Québec, June 8-12, 2003). Las muestras de Trastuzumab-DM1 se analizaron (Figuras 6 y 7). El procedimiento de reducción implicó hacer reaccionar el anticuerpo conjugado con 1,4-ditiotreitol (DTT) a 37 °C durante 30 minutos (Figuras 13 y 14). Aunque el DM1 también se escinde durante la reducción, un fragmento enlazador de 116 dalton permanece unido en el sitio de la conjugación. Los lotes del conjugado trastuzumab-DM1 y sus correspondientes precursores (conjugados de trastuzumab-enlazador SPP) se evaluaron analizando las muestras intactas y reducidas con CL/EM. El número de restos de DM1 o enlazador en cada cadena ligera (0, 1 o 2) y pesada (0, 1, 2, 3, 4 o 5) pueden diferir y cada anticuerpo tiene un par de cadenas ligeras y pesadas, lo que permite muchas combinaciones posibles.

Un adsorbente de la cromatografía de fase inversa de ejemplo adsorbente es una partícula de poliestireno reticulada tal como PLRP-S (Polymer Laboratories, Amherst, MA).

En una realización de ejemplo, la muestra biológica puede purificarse mediante cromatografía de intercambio catiónico (CIC) en una columna Dionex Pro Pac WCX-10. Las fracciones se recogieron, se concentraron con Centricon-30.

## 60 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

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 lotes, 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 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.

Diversos sistemas de espectrometría de masas capaces de una precisión de masa alta, alta sensibilidad y alta resolución se conocen en la técnica y pueden emplearse en los métodos de la invención. 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 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 CL/EM (Lee, M. "LC/MS Applications in Drug Development" (2002) J. Wiley & Sons, New York).

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 interaccionar 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 de la invención se pueden purificar parcialmente en el chip y después analizar rápidamente en el espectrómetro de masas. Al proporcionar diversos restos reactivos en diferentes sitios sobre una superficie de sustrato, el rendimiento puede aumentar.

Los espectrómetros de masas disponibles comercialmente pueden obtener muestras 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.

Se desarrolló un método para la cuantificación simultánea de pequeñas moléculas y conjugados de fármaco-anticuerpo mediante CL/CL/EM. Para lograr esto, cada parte se desarrolló por separado y después se combinó. También se desarrolló un método de CL/EM/EM para cuantificar el resto de fármaco y los metabolitos utilizando el instrumento PROSPEKT-2® (Spark Holland) para la extracción en fase sólida en línea (SPE), (SPE), cromatografía en fase inversa SYNERGI™ C12 (Phenomenex, Torrance, CA) para separación cromatográfica y un espectrómetro de masas API 3000 para detección (Kadkhodayan, M. y Mann, E. "New Strategies in Characterization and Quantitation of Antibody-targeted Drug Conjugates in Plasma using LC/LC/MS", 51st Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry, Montréal, Québec, June 8-12, 2003; Beaudry et al (1998) Rapid Commun. Mass Spectrom. 12:1216-1222; Simpson et al (1998) Rapid Commun. Mass Spectrom. 12:75-82), y como se detalla en el ejemplo 1. Esta porción de molécula pequeña del método tenía un intervalo de 0,3 a 750 ng/ml para fármacos de auristatina y maitansinoide. Se obtuvieron curvas lineales en plasma ( $R^2 = 0,999$ ).

La cuantificación de las especies de anticuerpos se llevó a cabo mediante monitorización de ion único (SIM) usando un ion de cada especie de interés (LC y LC + 1D). Esto permitió la comparación de cantidades relativas de cada especie de conjugado en plasma. Las curvas lineales en solución y plasma se muestran en las Figuras 16 y 17 para la cadena ligera no modificada (LC) y conjugada (LC + D) del anticuerpo, respectivamente.

La Figura 18 muestra una curva de calibración para el fármaco libre MMAE en plasma de rata, con un LIC de 0,1 ng/ml. El método CL/CL/EM para anticuerpos se combinó con el método de SPE para moléculas pequeñas en el instrumento PROSPEKT-2 El método combinado realiza el aislamiento por afinidad del conjugado de anticuerpo, extracción de SPE en línea del fármaco libre, separación en fase inversa de la molécula pequeña, seguido de separación de fase inversa del anticuerpo conjugado. La corriente de residuos de la columna de inmovinoafinidad (que contiene el fármaco libre) se dirige a través del cartucho C18 SPE antes de descartarla. El cartucho de SPE se eluye mientras que el plasma se lava de la columna de afinidad y, finalmente, la columna de afinidad se eluye. Por tanto, se generan dos archivos de datos a partir de una inyección de plasma y proporcionan datos de cuantificación valiosos para las especies de anticuerpos conjugados *in vivo*.

#### ELECTROMETRÍA DE MASAS DE IONIZACIÓN PR ELECTROPULVERIZACIÓN (ESI)

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 menos la masa del catión ( $C+$ ) por el número de cargas ( $n$ ) en dicho ion.

$$PM = n(m/z - nC+)$$

La ionización por electropulverización (ESI) es compatible con los métodos de separación de líquidos (frontal), así como los métodos de EM/EM (extremo posterior) ("espectrometría de masas de ionización por electropulverización: Fundamentals, Instrumentation, and Applications", Cole, R.B., Ed. (1997) Wiley, New York. Una solución diluida de un péptido, proteína, u otra biomolécula se puede introducir en el sistema de espectrómetro de masas a través de la bomba de jeringa, inyección de flujo o CL/EM. Los datos de ESI-EM 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 de ionización de ESI, por lo general se observan solo iones de carga múltiple. Por tanto, en los espectros de ESI se observan muchos picos  $m/z$  para macromoléculas que representan un único peso molecular. El cálculo del peso molecular se puede lograr resolviendo dos ecuaciones con dos desconocidas o adquiriendo software de desconvolución de un proveedor que calcule automáticamente la masa de la macromolécula.

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 una realización, 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 del siguiente modo:

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  $\geq 100.000$  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  $\leq 100.000$  unidades de masa. Los parámetros de ácido, disolvente y DP afectan ionización del anticuerpo intacto y reducido. El efecto de ionización de reducir el ácido del 0,2 % al 0,05 % se muestra en la Figura 1. 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  $m/z$ ). Los espectros de masas C y D en la Figura 1 muestran que a media que aumenta el potencial de desagrupamiento (PD) de 30-120 V a 70-190 V, la carga en el anticuerpo aumenta todavía más. Así, la tensión aplicada, la composición del disolvente y los agentes de emparejamiento de iones son factores a tener en cuenta y ajustar.

Para demostrar que la cubierta de la proteína no cambia, los iones se seleccionaron de una amplia gama de  $m/z$  y se representó la concentración frente a la intensidad de pico (Figura 2). Linealidad se puede obtener en una amplia gama de  $m/z$ . La Figura 2 muestra los estados cargados de un anticuerpo anti-HER2, trastuzumab (HERCEPTIN®), obtenidos de una exploración Q1 de una cadena ligera del anticuerpo. Para la cuantificación de las cantidades de anticuerpo intacto o de la cadena pesada, fragmentos o ADC, se sugiere la desglicosilación del anticuerpo. La glicosilación contribuye a una menor eficiencia de ionización y a una sensibilidad, por lo tanto, reducida. Generalmente, también produce curvas de calibración no lineales (cuadráticas). La Figura 3 muestra ESI-EM de trastuzumab glicosilado y desconvolución espectral. La Figura 4 muestra las curvas de calibración para la cuantificación por ESI-EM de: trastuzumab intacto ( $\alpha$ Her2) y trastuzumab intacto desglicosilado. La Figura 5 muestra las curvas de calibración para la cuantificación mediante ESI-EM de la cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC) del trastuzumab reducido.

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. La figura 6 muestra ESI-EM de un conjugado de anticuerpo, trastuzumab-SPP-DM1, después de la desglicosilación con PNGasaF y la escisión hidrolítica de DM1. La Figura 7 muestra un espectro de desconvolución de los datos en bruto de la figura 6.

En una realización se determina el intervalo de ion cargado para la cuantificación. Cuando se selecciona el intervalo de ion cargado para la cuantificación, se selecciona una región del espectro que no tenga interferencia de la matriz. Esto se determina experimentalmente para cada proteína y mediante la ejecución de un espectro Q1 (Figura 21), y la selección de un ión cargado tal como 2251.9 donde la región del espectro está libre de interferencias de la matriz.

En otra realización 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™ (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 sub-tabla de iones m/z utilizados para calcular estas masas a partir de las cuales se puede extraer los iones seleccionados para el método SIM.

Usando el m/z exacto se genera un método SIM para todas las especies para cuantificar. Se pueden seleccionar Varios iones cargados m/z para cada especie, dado que el estado cargado con la mayor relación señal - ruido puede no ser necesariamente el mejor estado cargado para la cuantificación debido a la interferencia de la matriz. A menudo el mejor estado cargado en el intervalo de m/z más alto (-1800 a 2700) debido a la falta de interferencia y resolución de la matriz. En una realización de ejemplo, el tiempo de permanencia para 1-10 iones está entre 150 y 200 microsegundos cada uno. Si se están controlando más de diez iones, el tiempo de permanencia deberá ajustarse a de 75 a 100.

La Figura 22 muestra cromatogramas de las muestras de plasma de rata solución aisladas mediante selección, reducción y desnaturalización con membrana de inmutofinidad (IAM) de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE. La Figura 23 muestra monitorización de ion único (SIM) de fragmentos reducidos desglicosilados de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE en plasma de rata. (arriba) cadena ligera; (centro) cadena ligera con un MMAE; (abajo) cadena pesada con tres MMAE. La Figura 24 muestra una curva de calibración para el ion 2251 m/z de la cadena ligera con un resto de fármaco MMAE (LC + 1 MMAE) de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE en plasma de rata, con un LIZ de 149 ng/ml.

El método SIM se puede utilizar para preparar una curva de calibración en la matriz de la muestra para cuantificar las especies deseadas. El DP puede ser ajustado para cada ion y las muestras de ensayo se pueden pasar para determinar experimentalmente esta variable para cada especie, como se muestra en la Figura 1. Un buen punto de partida de DP es de 50 a 150 voltios en incrementos de 10 unidades de tensión. El límite inferior de cuantificación (LIC) de LC + 1 MMAE del conjugado de trastuzumab en la Figura 10 es 140 ng/ml. Una vez que el método se optimiza, se genera una curva de calibración en la matriz de la muestra y los datos adquiridos se procesan utilizando el software disponible comercialmente. Un método de doble columna de afinidad (Ejemplo 1) se usa para la linealidad y la variabilidad de la placa completa. La curva de calibración del anticuerpo a partir de anticuerpos recuperados de esta membrana demostró gran linealidad ( $R^2= 0,9993$ ) para un intervalo de 0,14  $\mu\text{g/ml}$  a 75  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 10), y la precisión de la placa completa (Figura 11).

La cuantificación se llevó a cabo mediante monitorización de ion único (SIM) usando un ion de cada especie de interés (LC y LC + 1). Esto permitió la comparación de cantidades relativas de cada especie de conjugado en plasma. Las curvas lineales en solución ( $R^2= 0,9993$  y  $0,9986$ ) y plasma ( $R^2= 0,9980$  y  $0,9994$ ) se obtuvieron tanto para trastuzumab sin modificar (Figura 16) como para el conjugado anticuerpo-fármaco, trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, (Figura 17), respectivamente (Kadkhodayan, M. y Mann, E. "New Strategies in Characterization and Quantitation of Antibody-targeted Drug Conjugates in Plasma using LC/LC/MS", 51st Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry, Montréal, Québec, June 8-12,2003). La Figura 19 muestra: (arriba) un cromatograma de iones totales de rastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE reducido y desnaturalizado; (centro) los espectros de masas de la cadena ligera con un MMAE; y (abajo) los espectros de masas de la cadena pesada, con tres MMAE. La Figura 20 muestra los espectros de masas de desconvolución de fragmentos de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE reducido: (arriba) LC+1 MMAE y (abajo) HC+3 MMAE.

La Figura 25 muestra el análisis LC de dos preparaciones del conjugado anticuerpo anti-EphB2R-fármaco, 2H9-MC-vc-PAB-MMAE, con asignaciones de fragmentos; LC + 0, 1 + LC, HC + 0, HC + 1, HC + 2, HC + 3, HC + 4. 2H9 es un anticuerpo IgG1 con una fuerte afinidad por el receptor de efrina B. 2H9 también tiene 5 grupos disulfuro, con un potencial para hasta 10 grupos tiol de cisteína reactivos tras la reducción. La Figura 26 muestra el análisis CL/EM de dos preparaciones de 2H9-MC-vc-PAB-MMAE, con la recogida de datos de Q1 para la caracterización. La Tabla 1 recoge las áreas integradas de los fragmentos de las dos preparaciones de ADC, 2H9-MC-vc-PAB-MMAE, y establece la carga de fármaco en las cadenas ligeras y cadenas pesadas, y por lo tanto, la carga total de fármaco por anticuerpo. La carga total promedio de fármaco por 2H9 se calculó a partir de la suma de los dos fragmentos de HC y dos de LC La carga total promedio de fármaco por 2H9 para la preparación de ADC en la parte superior de las

Figuras 25 y 26 fue 3,5 MMAE/2H9. La carga total promedio de fármaco por 2H9 para la preparación de ADC en la parte inferior de las Figuras 25 y 26 fue 5,1 MMAE/2H9.

Tabla 1. Caracterización CL/EM de fragmentos de dos preparaciones de 2H9-MC-vc-PAB-MMAE, de la solución: MMAE/2H9 = 3,5 y 5,1

MMAE/2H9 = 3,5			
fragmento	MMAE por fragmento	Área	% proporción
Cadena pesada	0	151,1	16,7
Cadena pesada	1	336,2	37,1
Cadena pesada	2	266,7	29,5
Cadena pesada	3	125,8	13,9
Cadena pesada	4	25,2	2,8
			MMAE/HC = 1,49
Cadena ligera: j	0	304,9	75,4
Cadena ligera	1	99,4	24,6
			MMAE/LC = 0,25
MMAE/2H9 = 5,1			
fragmento	MMAE por fragmento	Área	% proporción
Cadena pesada	0	126,3	12,6
Cadena pesada	1	135,1	13,5
Cadena pesada	2	182,2	18,1
Cadena pesada	3	250,8	25,0
Cadena pesada	4	310	30,9
			MMAE/HC = 2,48
Cadena ligera	0	384,4	91,2
Cadena ligera	1	37,3	8,8
			MMAE/LC = 0,088

Se realizó una identificación CL/EM similar y caracterización del conjugado anticuerpo-fármaco, trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE. Una preparación dio una carga de la cadena ligera de 1,0 (MMAF/LC) y una carga de la cadena pesada de 2,9 (MMAE/HC), por lo tanto, una carga total de fármaco de 7,8 (MMAE/trastuzumab). Otra preparación dio una carga de la cadena ligera de 1,0 (MMAF/LC) y una carga de la cadena pesada de 1,6 (MMAE/HC), por lo tanto, una carga total de fármaco de 5,1 (MMAE/trastuzumab).

Las figuras 28 - 31 muestran los resultados del análisis farmacocinético (FC) de muestras de plasma mediante CL/EM. A ratas Sprague-Dawley se les administraron dos preparaciones de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE cargadas con un promedio de 8,7 o 5,3 MMAE, restos de fármaco por anticuerpo, trastuzumab. Las figuras 28 y 29 muestran el análisis FC de muestras de CL/EM de plasma de ratas Sprague-Dawley a las que se ha administrado: trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (8,7 MMAE/trastuzumab), 2 mg MMAE/kg (Figura 28); y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (5,3 MMAE/trastuzumab), 2 mg MMAE/kg (Figura 29). Se calcularon las concentraciones de las diversas cadenas pesadas y ligeras, con y sin restos de fármacos conjugados. La Figura 30 muestra el gráfico de la relación porcentual del nivel de conjugación de MMAE de fragmentos de LC (cadena ligera) y de HC (cadena pesada) de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (5,3 MMAE/trastuzumab). La Figura 31 muestra una comparación de variaciones en la distribución del fármaco (MMAE) y el anticuerpo (trastuzumab) en el tiempo para dos preparaciones de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE: Una preparación tenía una relación de fármaco a anticuerpo de 8,7 MMAE/trastuzumab, y la otra fue la preparación mostrada en la Figura 31, que tenía una relación de 5,3.

Las figuras 32-36 de muestran los resultados de un estudio farmacocinético de comparación del efecto de carga del fármaco. Se preparó un lote único de conjugado anticuerpo-fármaco trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF. Los picos del cromatograma se identificaron mediante EM, que indicó las cargas de fármaco de 2, 4 y 6 de MMAF por anticuerpo, trastuzumab (Figura 32). La figura 32 muestra los cromatogramas de interacción hidrofóbica (HIC) de: arriba) mezcla bruta de trastuzumab-MC-vc-MMAF con carga de fármaco de 0, 2, 4, 6; (segundo desde arriba) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6; (centro) trastuzumab-MC-vc-MMAF con carga de fármaco de 4; (segundo

desde abajo) trastuzumab-MC-vc-MMAF con carga de fármaco de 2; (abajo) trastuzumab.

Los componentes bajo cada pico principal se separaron, aislaron y se caracterizaron mediante CL/EM. La figura 33 muestra el análisis CL/EM después de la reducción y desnaturalización de: (arriba) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 2; (centro) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4; (abajo) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6. La muestra con la carga de fármaco de 2 (arriba) mostró un 53,1 % y 46,9 % de LC + 1 fragmento de cadena ligera y 51 % de HC y 49,0 % HC + 1 de fragmentos de cadena pesada. Las áreas totales para LC, LC + 1, HC y HC + 1 dieron una carga de fármaco total calculada de 1,9 MMAF/Ab. La muestra con carga de fármaco de 4 (centro) mostró 60,1 % de LC y 39,9 de LC+1 de los fragmentos de cadena ligera y 49,1 % HC + 1, 48,1 % de HC + 2, 2,8 % de HC + 3 de fragmentos de cadena pesada. Las áreas totales para LC, LC+1, HC+1, HC+2, y HC+3 dieron una carga de fármaco total calculada de 3,9 MMAF/Ab. La muestra con carga de fármaco de 6 (abajo) mostró 55,2 % de LC y 39,9 de LC+1 de los fragmentos de cadena ligera y 7,6 % HC + 1, 46,7 % de HC + 2, 45,7 % de HC + 3 de fragmentos de cadena pesada. Las áreas totales para LC, LC+1, HC+1, HC+2, y HC+3 dieron una carga de fármaco total calculada de 55 MMAF/Ab. La Figura 34 muestra el análisis mediante EM con la caracterización en masa de fragmentos con 0, 1, 2, y 3 restos de fármaco MMAF en la cadena pesada de: (arriba) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 2; (centro) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4; (abajo) trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6.

El fármaco libre, MMAF, se detectó en el plasma de ratas tratadas con trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 2 (51,73 g de ADC/kg); trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4 (26,12 mg de ADC/kg); y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6 (17,59 mg de ADC/kg). Al 5º día, el MMAF libre fue 1,80 ng/ml en las ratas que recibieron trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 2. Al 5º día, el MMAF libre fue de 9,09 ng/ml en las ratas que recibieron trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco 4. Al 4º día, el MMAF libre fue de 50,81 ng/ml en las ratas que recibieron trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6. La presencia de fármaco libre en plasma es consistente con la disminución medida en la relación fármaco/Ab con el tiempo detectado en el plasma de las ratas tratadas con los tres conjugados de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con cargas 2, 4, y 6 cargas de fármaco (Ejemplo 9).

La Figura 35 muestra una comparación de las variaciones de la proporción entre el fármaco (MMAF) y el anticuerpo (trastuzumab) con el tiempo para el aclaramiento trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 2; trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4; y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 6 a partir de muestras de plasma de ratas analizadas mediante selección con membrana selección membrana inmunoafinidad/CL/EM (Ejemplo 2). La Figura 36 muestra con más detalle los cambios en la relación entre el fármaco y el anticuerpo mediante una comparación de los niveles de conjugación de la cadena ligera y la pesada en el tiempo para trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con cargas de fármaco de 2, 4 y 6 a partir de muestras de plasma de rata analizadas mediante membrana de selección en la membrana de inmunoafinidad/CL/EM.

Las figuras 37 y 38 muestran los resultados de un estudio farmacocinético DE comparación de las diferencias entre los restos de fármaco MMAE y MMAF en un conjugado DE anticuerpo-fármaco, con cargas de fármaco similares. Las ratas recibieron vehículo control; 20,2 mg de ADC/kg de rastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE con la carga promedio del fármaco de 5,3; y 26,12 mg/kg de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4. Las dosis esencialmente normalizan la cantidad de fármaco administrado. El análisis CL/EM al 4º día mostró que las muestras de plasma de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE aclaradas mostraban que los fragmentos de cadena pesada no tenían esencialmente ningún fármaco restante en el conjugado, y los fragmentos de la cadena ligera tenían 0,9 de MMAF por LC. El análisis CL/EM al 4º día mostró que las muestras de plasma de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF mostraban que los fragmentos de cadena pesada tenían 0,9 de MMAF por HC, y los fragmentos de cadena ligera tenían 0,4 de MMAF por LC. La Figura 37 muestra una comparación del cambio de las relaciones fármaco/anticuerpo en el tiempo entre el fármaco y la LC (cadena ligera) y el fármaco y la HC (cadena pesada) en el tiempo para trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE con una carga de fármaco promedio de 5,3 y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con una carga de fármaco de 4. El gráfico muestra que las tasas relativas de la degradación de los grupos de fragmentos son: HC-MMAE > HC-MMAF > LC-MMAF > LC-MMAE. La Figura 38 muestra la velocidad relativa de pérdida de fármaco de la LC (cadena ligera) y HC (cadena pesada) de muestras de trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE con carga promedio de fármaco de 5,3; y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF con carga de fármaco de 4.

Un anticuerpo Fab anti-HER2, 4D5, se analizó antes y después de la conjugación con un resto de fármaco de maitansinoide, DM1. La Figura 40 muestra el análisis de espectrometría de masas con desconvolución que representa la intensidad en cuentas por segundo (cps) frente a unidades de masa atómica (uma) de las muestras. El Fab 4D5 desnudo (arriba a la izquierda) muestra principalmente una sola masa. Después de la reducción del grupo disulfuro, el 4D5 desnudo se separa en la cadena ligera y la cadena pesada (parte inferior izquierda). Una preparación del conjugado anticuerpo-fármaco, Fab de 4D5-SPP-DM1, muestra una distribución de las especies, con 0, 1, 2, 3, y 4 restos de fármaco DM1 (parte superior derecha). Después de la reducción de los grupos disulfuro de anticuerpos y el enlace disulfuro del enlazador SPP, la preparación de Fab de 4D5-SPP-DM1 mostró fragmentos que se pueden asignar a las especies de la cadena pesada y ligera (abajo a la derecha), con enlazador parcial (SP) que quedan en los fragmentos.

Los metabolitos de los conjugados anticuerpo-fármaco pueden aislarse y caracterizarse por los métodos de la invención a partir de muestras farmacocinéticas. Por ejemplo, la figura 41 muestra el análisis por espectrometría de masas que representa la intensidad en cuantas por segundo (cps) frente a las unidades de masa atómica (uma) de un metabolito de trastuzumab-MC-MMAF con una masa de aproximadamente 8178 uma, capturada en una membrana de afinidad con el anticuerpo anti-auristatina a partir de una muestra en plasma *in vivo* de macaco. La Figura 42 Muestra el área del pico del metabolito de 8178 unidades de masa (+5 ion de 1636 m/z) capturado en una membrana de afinidad del anticuerpo anti-auristatina de muestras de plasma *in vivo* de macaco, recogidas a puntos de tiempo de hasta 120 horas tras la administración de trastuzumab-MC-MMAF.

La Figura 43 muestra un gráfico de fragmentos de la cadena ligera detectados mediante espectrometría de masas de muestras de plasma recogidas en los puntos de tiempo (horas) tras la administración de trastuzumab-SMCC-DM1 a macacos. Los fragmentos de la cadena ligera se caracterizan por su masa conjugada a 0, 1 y 2 restos de fármaco DM1 y se les asignó una proporción en porcentaje con los fragmentos de la cadena ligera totales de trastuzumab-SMCC-DM1.

La Figura 44 muestra un gráfico de fragmentos de la cadena ligera detectados mediante espectrometría de masas de muestras de trastuzumab-SMCC-DM1 en tampón (PBS y 0,5 % de BSA), a puntos de tiempo de incubación (horas). Los fragmentos de la cadena ligera se caracterizan por su masa conjugada a 0, 1 y 2 restos de fármaco DM1 y se les asignó una proporción en porcentaje con los fragmentos de la cadena ligera totales de trastuzumab-SMCC-DM1.

La Figura 45 muestra un gráfico de fragmentos de la cadena pesada detectados mediante espectrometría de masas de muestras de plasma recogidas en los puntos de tiempo (horas) tras la administración de trastuzumab-SMCC-DM1 a macacos. Los fragmentos de la cadena pesada se caracterizan por su masa conjugada a 0, 1 y 2 restos de fármaco DM1 y se les asignó una proporción en porcentaje con los fragmentos de la cadena pesada totales de trastuzumab-SMCC-DM1.

La Figura 46 muestra un gráfico de fragmentos de la cadena pesada detectados mediante espectrometría de masas de muestras de trastuzumab-SMCC-DM1 en tampón, a puntos de tiempo de incubación (horas). Los fragmentos de la cadena pesada se caracterizan por su masa conjugada a 0, 1 y 2 restos de fármaco DM1 y se les asignó una proporción en porcentaje con los fragmentos de la cadena pesada totales de trastuzumab-SMCC-DM1.

La Figura 47 muestra un gráfico del anticuerpo que queda conjugado con un resto de fármaco en: (líneas superiores) muestras de tampón del conjugado anticuerpo-fármaco, trastuzumab-MC-MMAF; y (líneas inferiores) muestras de plasma recogidas de macacos tras la administración de trastuzumab-MC-MMAF a puntos de tiempo de hasta 70 horas. La fracción de anticuerpo conjugado con un resto de fármaco se midió mediante el método de CL/EM (líneas continuas) y mediante una prueba de ELISA doble (líneas discontinuas). Los métodos de CL/EM y ELISA se correlacionan bien para las muestras tanto con tampón como para farmacocinética *in vivo*.

La Figura 48 muestra un gráfico de cuantificación en  $\mu\text{g/ml}$  de un conjugado anticuerpo Fab fármaco, 4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAE en muestras de plasma recogidas de macacos tras la administración de trastuzumab-MC-MMAF, a puntos de tiempo hasta 60 horas mediante la prueba CL/EM (línea discontinua) y la prueba ELISA (línea continua). Una comparación de los resultados se proporciona en la Tabla 2.

Tabla 2

Tiempo (horas)	ELISA	CL/EM	% diferencia entre ELISA y CL/EM
	Fab total ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fab total ( $\mu\text{g/ml}$ )	
5	89.84	100.23	11.6
15	67.05	72.46	8.1
30	4.4.01	43.91	-0.2
45	30.42	24.67	-18.9
60	22.49	18.83	-16.3

## Ejemplos

### Muestras y reactivos

El acetonitrilo de calidad para HPLC se adquirió en Burdick y Jackson (Muskegon, MI). El ácido fórmico (FA) se adquirió de Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ). El ácido trifluoroacético (TFA) y 1,4-ditio-DL-treitol (DTT) se adquirieron de Avocado Research Chemicals Ltd. (Ward Hill, MA). La enzima PNGaseF se adquirió de Prozyme (San Leandro, CA). Las columnas de polímero PLRP-S se adquirieron en Polymer Laboratories (Amherst, MA).

Instrumentación

Se usó un espectrómetro de masas API 3000 para las realizaciones de la invención descritas en el presente documento y se adquirió en Applied Biosystems (Foster City, CA). Un automuestreador CTC HTS-PAL automático se adquirió de Leap Technologies (Carrboro, NJ). Las bombas (LC-10AD) de la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) Shimadzu y el controlador del sistema (SCL-10A) se adquirieron de Shimadzu Corporation (Columbia, MD). Un calentador de columna de bolsillo caliente Keystone Scientific se adquirió en Thermo (Waltham, MA). Una válvula de conmutación se adquirió de Valco Instruments Co. Inc. (Houston, TX).

10 Método HPLC para proteínas pequeñas

Se usó un método de HPLC de fase inversa para la detección de anticuerpos reducidos usando una columna de poliestireno reticulado/divinilbenceno PLRP-S 8 $\mu$ , 1000Å, 2,0 x 50 mm. Las fases móviles A y B consistían en 0,05 % de TFA en agua y acetonitrilo, respectivamente. La temperatura de la columna se calentó a 70 ° C. Se usó un gradiente de 9 minutos para el análisis de patrones y muestras: (0,0-1,0 min, 500  $\mu$ l/min, 0 % B; 1,0-1,1 min, 500-250  $\mu$ l/min, 0-30 % B; 1,0-1,1 min, 250  $\mu$ l/min, 30 % de B; 1,1-1,5 min, 250  $\mu$ l/min, 30 % de B; 1,5-5,5 min, 250  $\mu$ l/min, 30-50 % de B; 5,5-6,5 min, 250  $\mu$ l/min, 50-80 % de B; 6,5-7,5 min, 250  $\mu$ l/min, 80 % de B; 7,5-7,6 min, 250  $\mu$ l/min, 0 % de B; 7,6-9,0, 250  $\mu$ l/min, 0 % de B). El volumen de inyección para este método es de 100-300  $\mu$ l porque las muestras eran diluidas. Los volúmenes de inyección para la caracterización pueden ser 10-20  $\mu$ l, mientras que los volúmenes de inyección para las muestras de membrana pueden ser de 200-500  $\mu$ l. Una válvula de conmutación (Valco Instruments, Co, Inc., Houston, TX) se utiliza para desviar los tampones de muestra a los residuos (0,0-1,8 minutos). La cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC) del anticuerpo eluye a aproximadamente 4,41 y 4,76 minutos, respectivamente.

25 Método HPLC para proteínas grandes

Se usó un método de HPLC de fase inversa para la detección de anticuerpos intactos usando una columna de poliestireno reticulado/divinilbenceno PLRP-S 8 $\mu$ , 4000Å, 2,0 x 50 mm. Las fases móviles A y B son 0,1 % de TFA en agua y acetonitrilo, respectivamente. La temperatura de la columna se calentó a 70 °C. Se usó un gradiente de 8 minutos para el análisis de patrones y muestras: (0,0-2,5 min, 500  $\mu$ l/min, 0 % de B; 2,5-3,5 min, 500  $\mu$ l/min, 50 % de B; 3,5-5,0 min, 500  $\mu$ l/min, 50 % de B; 5,0-6,4 min, 500  $\mu$ l/min, 100 % de B; 6,4-6,5 min, 500  $\mu$ l/min, 100-0 % de B; 6,5-8,0, 500  $\mu$ l/min, 0 % de B). El volumen de inyección para este método es de 10  $\mu$ l. Una válvula de conmutación desvía los tampones de muestra para residuos (0,0-2,5 minutos). El anticuerpo intacto eluye a aproximadamente 3,5 minutos.

35 Condiciones del espectrómetro de masas (EM)

Se utilizó el modo de exploración Q1 (1200 a 2500 m/z para proteínas pequeñas, y 1800 a 3.000 m/z para proteínas grandes) para adquirir datos sobre el API de 3000 para el modo de exploración completa. El potencial de la desagrupación (DP) se elevó de 30 a 120 o de 70 a 250 voltios, dependiendo de las soluciones de caudal en la fuente. Se usaron los siguientes parámetros adicionales: el gas nebulizador (NEB) fue 12,0, gas cortina (CUR) fue 10,0, la tensión de pulverización iónica (IS) fue 5500, la temperatura (TEM) fue de 300-500 dependiendo del caudal de la columna, el potencial de enfoque (FP) fue 400V, el potencial de entrada fue de 10,0V, y el deflector (DF) fue -100V. Los métodos de monitorización de ion único (SIM) del anticuerpo reducido utilizaron una tensión DP de 75 V.

45 Ejemplo 1Método de cambio de cromatografía de inmunoafinidad y columna HPLC de fase inversa

Se usó un método de cambio de columna de CL/EM/inmunoafinidad para el análisis del ADC y cuantificación del resto de fármaco de molécula pequeña y los metabolitos. Se usó un instrumento PROSPEKT-2® (Chromatographic Specialties, Inc., Brockville, Ontario) para el lavado y cambio automático de la columna antes de la introducción en el espectrómetro de masas. El método inmunoafinidad/CL/EM. El método de inmunoafinidad/CL/EM realiza el aislamiento por afinidad del conjugado de anticuerpo, extracción de SPE en línea del fármaco libre, separación en fase inversa de la molécula pequeña, seguido de separación de fase inversa del anticuerpo conjugado. La corriente de residuos de la columna de inmunoafinidad (que contiene el fármaco libre) se dirige a través del cartucho C18 SPE antes de descartarla. El cartucho de SPE se eluye mientras que el plasma se lava de la columna de afinidad y, finalmente, la columna de afinidad se eluye. Se generan dos archivos de datos a partir de una inyección de plasma y proporcionan datos de cuantificación valiosos para las especies de anticuerpos conjugados *in vivo*.

El método CL/EM/EM emplea el instrumento PROSPEKT-2 para SPE en línea (extracción en fase sólida), cromatografía de fase inversa (SYNERGI C12) para la separación cromatográfica, y un espectrómetro de masas API 3000 para la detección. El método para moléculas pequeñas tenía un intervalo de 0,3 a 750 ng/ml para los fármacos de auristatina MMAE y MMAF. Se obtuvieron curvas lineales en plasma,  $R^2= 0,999$  (Kadkhodayan, M. and Mann, E. "New Strategies in Characterization and Quantitation of Antibody-targeted Drug Conjugates in Plasma using LC/LC/MS", 51st Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry,

Montréal, Québec, June 8-12, 2003). Además, la porción de anticuerpo del método tenía un intervalo de 0,14 a 300 µg/ml y era lineal ( $R^2 = 0,999$ ), tanto en solución y plasma.

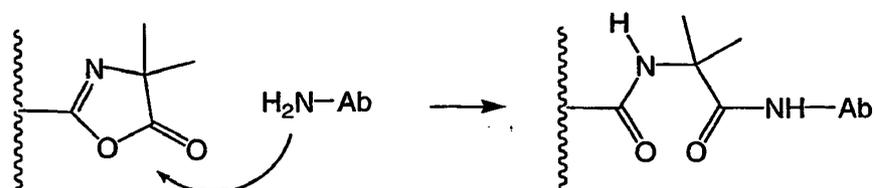
## Ejemplo 2

### Selección en membrana de inmunoafinidad y método de HPLC de fase inversa

Una selección en membrana de inmunoafinidad (IAM) y el método de HPLC de fase inversa se desarrollaron para caracterizar y cuantificar muestras biológicas (Mann, E. and Kadkhodayan, M. "Antibody Isolation and Quantitation using LC/MS and a Novel 96-Well Immunoaffinity Membrane", 52nd Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry, Nashville, TN, May 23-27, 2004). Se usó una membrana de afinidad disponible comercialmente en un formato de 96 pocillos, que permite la limpieza simultánea de 96 muestras. Un colector de vacío equipado con un medidor de presión (Aldrich) se utilizó para la carga, lavado y elución de la membrana. El indicador de presión se mantuvo a 20 psi para todos los lavados y a 5 psi durante las etapas críticas, tales como la inmovilización del antígeno, la aplicación de las muestras de plasma y elución de proteínas. Las muestras biológicas tales como plasma se liberaron en cada pocillo, se incubaron, se lavaron y se eluyeron de la membrana con 0,2 % de ácido trifluoroacético (TFA) en una placa de 96 pocillos cuadradas de 2 ml que se colocó directamente en el automuestreador para el análisis de la muestra mediante CL/EM.

Para el análisis de muestras de CL/EM se usó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 300 equipado con una columna de fase inversa (PLRP-S, 2,0 x 50 mm, 8µ, 1000Å). Se utilizó un gradiente de HPLC de 8 minutos usando acetonitrilo y agua con 0,05 % de TFA.

La inmovilización del antígeno y las condiciones de captura de anticuerpos se evaluaron y ajustaron (elección del tampón, concentración y pH). La química de inmovilización que implica la formación de enlaces estable entre los grupos funcionales de azolactona en la membrana y amina grupos EMPORE y los grupos amina en el antígeno de anticuerpo (Ab) se encuentra a continuación. Para la captura de trastuzumab un fragmento del 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). El número y la secuencia de los lavados (PBS, detergente Tween 20 diluido y agua Millipore™) se optimizaron para determinar la estrategia de limpieza más eficiente. El volumen óptimo de elución debe optimizarse para cada sistema de antígeno-anticuerpo. Las membranas EMPORE son normalmente reutilizables, por ejemplo, hasta 30 veces sin efectos adversos.



Se preparó una membrana de afinidad azalactona utilizando las condiciones optimizadas y se analizó la linealidad y la variabilidad de la placa completa. La curva de calibración del anticuerpo a partir de anticuerpos recuperados de esta membrana demostró gran linealidad ( $R^2 = 0,9993$ ) para un intervalo de 75 µg/ml a 0,14 µg/ml (Figura 10). El experimento variabilidad de toda la placa resultó en un 6,0 % de CV para toda la placa y de 2,5 a 8,0 % de CV para las siguientes filas y columnas que representan los 96 pocillos (8 x 12) en la figura 11. Por tanto, los recuentos del área bajo la curva muestran una precisión aceptable en toda la placa.

Ciertos anticuerpos están glicosilados con uno o más residuos de azúcar. El anticuerpo monoclonal analizado en la Figura 12 muestra los espectros del anticuerpo glicosilado antes (parte superior) y después de la desglicosilación (parte inferior). La heterogeneidad de los iones cargados disminuye en gran medida mediante la eliminación de azúcar que tiene como resultado una mayor precisión y sensibilidad. Se pueden llevar a cabo Las reacciones enzimáticas en la membrana, tales como la desglicosilación usando PNGasaF (Figura 12).

### Procedimiento de inmovilización en membrana de afinidad

1) Preparación del compuesto antigénico para la inmovilización. Se selecciona un antígeno o anticuerpo apropiado para la captura del analito de interés y la proteína debe intercambiarse en una solución rica en sales de (sulfato de sodio 1 M y fosfato de sodio 0,1 M a pH = 7,5) o (citrato de amonio 1 M y de fosfato de sodio 0,1 M a pH = 7,5), antes de la inmovilización. La eficacia de la reacción con la membrana de afinidad de azalactona puede aumentar con un pH mayor (hasta pH = 9). Sin embargo, ya que las proteínas son inestables a niveles altos de pH, un pH de 7,5 a 8,0 puede ser un compromiso óptimo entre la reactividad y estabilidad. Se utilizan 5, 10 o 25 columnas NAP (Pharmacia) para el intercambio de tampón en las muestras. La proteína también debe mantenerse a la concentración más alta posible para conseguir las mejores condiciones de reacción.

2) La inmovilización del antígeno/anticuerpo en la placa de 96 pocillos de afinidad Empore™ de 3M La membrana de afinidad debe permanecer en el recipiente sellado justo hasta la adición de la proteína. Una cantidad diana típica de la proteína es de 100 µg por pocillo (aunque se puede añadir más o menos basado en el uso previsto). El volumen de solución proteica rica en sal (etapa 1) necesaria por pocillo se calcula con un volumen mínimo de 80 µl. El paquete que contiene la membrana de afinidad se abre y se añaden 100 µg de proteína por pocillo. La membrana se incubó a 37 °C durante dos horas. Dentro de los primeros 5 minutos después de la adición de la solución, las membranas pueden hincharse visiblemente.

3) Inactivación de la membrana de afinidad Empore™ de 3M La solución de proteína se debe pasar por la membrana con un vacío ligero (-10 mm Hg). Se usa etanolamina para enfriar los sitios de azalactona sin reaccionar sobre la membrana. Se añaden aproximadamente 500 µl de etanolamina 3M para ajustar a pH 8 y tirar a través de la membrana utilizando un colector de vacío. Se añaden otros 500 µl de de etanolamina 3M a pH = 8 y la membrana se incuba durante una hora a 37 °C. La etanolamina es extrae mediante vacío a través de la membrana y cada pocillo se lava con 500 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato).

4) El bloqueo de los sitios de unión no específica. Aproximadamente 1 ml de de seroalbúmina bovina (BSA) al 0,5 % se añadió a cada pocillo de la membrana de afinidad. Esta se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución de BSA se tiró a través de cada pocillo mediante vacío y después se lavó adicionalmente con 1 ml de PBS. Ahora, la membrana está lista para su uso. La membrana se almacena en una solución cubierta a 4 °C con 200 µl de de azida de sodio al 0,02 % en PBS por pocillo. Se añade PBS adicional si es necesario para evitar que los pocillos se sequen.

#### Procedimiento membrana de afinidad para uso

1) Captura de la diana en la membrana de 96 pocillos de afinidad Empore™ de 3M Una membrana de inmovinoafinidad preparada con antígeno/anticuerpo inmovilizado se utiliza para la captura de una proteína o anticuerpo diana en plasma. La proteína/anticuerpo diana en solución puede capturarse utilizando la membrana, sin embargo la unión no específica a los pocillos puede ser un problema. Lavar cada pocillo con 1 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato) antes de su uso. Añadir 100 µl de plasma o suero neto que contiene la proteína/anticuerpo diana a la membrana. Incubar la membrana a 37 °C durante 30 minutos. Tirar de la muestra a través de la membrana con un vacío suave (-10 mm Hg).

2) Lavado/Desglicosilación de la diana capturada. Cada pocillo deberá lavarse con los siguientes lavados de 1 ml consecutivos: una vez con PBS, una vez con PBS + 1,6 % de Tween 20, y tres veces con agua. Si se desea la desglicosilación del compuesto capturado, añadir 100-µl de solución de desglicosilación a cada pocillo de la membrana e incubar en la membrana durante 2 días a 37 °C. Lavar cada pocillo dos veces con 1 ml de agua después de una reacción de desglicosilación en membrana. (Solución desglicosilación = 110 µl de la enzima N-glicanasa (*Prozyme*) + 8140 µl de agua + 2750 µl de solución de fosfato sódico 80 mM a pH = 7,5).

3) Elución de la diana. Cada par antígeno-anticuerpo tiene un volumen de elución único basado en la afinidad. Determinar experimentalmente el volumen de elución requerido para sus compuestos antes de su uso. Tratar un pocillo cuadrado de 2 ml de fondo de una placa de 96 pocillos, con tampón de bloqueo 3M Empore mediante la adición de 2 ml a cada pocillo, incubar la placa durante 15 minutos a 37 °C, lavar la placa cinco veces con agua y secar la placa. Este recubre la placa para evitar la adherencia de la diana. Este recubrimiento sólo se puede utilizar en soluciones acuosas, ya que se disolverá en disolventes orgánicos. Eluir la diana utilizando un pH alto (típico es de 300-500 µl de 0,2 % de TFA) en la placa de 96 pocillos bloqueada con un vacío suave. La diana eluida está lista para su análisis.

4) Reducción de la muestra. Si se requiere una reducción de la muestra, añadir 8 µl de solución reductora para muestrear en la placa de 96 pocillos. Mezclar suavemente con una pipeta. Incubar la placa de 96 pocillos cubierta durante 1 hora a 37 °C. (solución de reducción = 900 µl de acetato de amonio 5M y 100 µl de clorhidrato de tris-(2-carboxi-etil) fosfina 1 M (TCEP)).

### **Ejemplo 3**

#### **Método en chip nanomate ESI**

Se desarrolló un método en chip de nanoelectropulverización automática para el análisis de espectrometría de masas de las muestras en plasma de conjugados de anticuerpo-fármaco (Kadkhodayan, M. and Mann, E. "Rapid Antibody Characterization and Quantitation using Automated Chip-based Nanoelectrospray/MS", 52nd Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry, Nashville, TN, May 23-27, 2004).

Se utilizó un API 3000 equipado con NANOMATE 100 y se usó el ESI CHIP. El sistema de instrumentos NANOMATE 100 es una interfaz de nanopulverización comercialmente disponible que utiliza un chip de ESI que contiene 100 boquillas individuales para infusión de nanopulverización automatizada en el espectrómetro de masas, lo que tiene resultado un caudal bajo y controlada con una sensibilidad más alta (LIC más bajo), consumo de muestra reducido, automatización y la eliminación de beneficios remanentes de la muestra. La muestra se aspira a través de puntas de pipeta conductoras se libera en la parte posterior de una boquilla en el chip. Se aplica alto voltaje a la pipeta, formando un penacho de electropulverización de 100 nl/min. Los ajustes NANOMATE fueron aspiración de la muestra de 5 ml, seguido de un espacio de aire de 3 ml para proporcionar 0,2 minutos de basal antes del pico de la muestra. La presión del gas usada fue 0,4 psi y la tensión aplicada para nanopulverización fue

1,6 kV en modo positivo. Se encontró que el tiempo de infusión de un minuto tenía una relación S/N (señal-ruido) óptima.

5 Se usaron dos sistemas de disolventes diferentes para las separaciones de anticuerpos intactos y reducidos, respectivamente, con el método de ESI chip NANOMATE® (Advion BioSciences, Inc., Ithaca, NY). El procedimiento de reducción implicó el uso de Tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato como agente reductor, y N-etil-maleimida como agente alquilante. Todas las muestras se intercambiaron de de disolvente usando columnas NAP 5. La composición final fue acetato de amonio 2,5 mM en 50 % de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %.

10 Las condiciones de ionización para los anticuerpos intactos y reducidos se optimizaron mediante la investigación de diversos parámetros, tal como el porcentaje de ácido, la concentración de agente de par iónico y la elección disolvente orgánico. La tensión de DP era un parámetro importante en la obtención de datos de alta calidad. Utilizando las condiciones optimizadas, la caracterización de diversos anticuerpos reveló información sobre la distribución de carbohidratos.

15 Las curvas de calibración obtenidas mediante los caudales de nanoelectropulverización (100 nl/min) mostraron un aumento de 40 veces la sensibilidad en comparación con los caudales de CL/EM (300 µl/min) con % CV que van desde 5 a 15 %. El intervalo lineal de este método fue de 4 a 300 pg/µl con una sensibilidad absoluta de 400 femtogramos (2,7 atomotes) utilizando un tiempo de infusión de 1 minuto.

20

#### **Ejemplo 4**

##### **Preparación de trastuzumab-MC-MMAE mediante conjugación de trastuzumab y MC-MMAE**

25 Trastuzumab, disuelto en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a pH 8,0, se trata con un exceso de ditiotreitól 100 mM (DTI). Después de incubación a 37 °C durante unos 30 minutos, el tampón se intercambia por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluyó con PBS con 1 mM de DTPA. El valor de tior/Ab se comprueba mediante la determinación de la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tior mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfría en hielo.

30

35 El reactivo enlazador de fármaco, maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir, MC-MMAE, disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a una concentración conocida, y se añade al anticuerpo reducido trastuzumab en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para inactivar la reacción y proteger todos los grupos tior del anticuerpos que no han reaccionado. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y el trastuzumab-MC-MMAE se purifica y desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles y se congela para su almacenamiento.

#### **Ejemplo 5**

##### **Preparación de trastuzumab-MC-MMAF mediante conjugación de trastuzumab y MC-MMAF**

45 Trastuzumab-MC-MMAF se preparó por conjugación de trastuzumab y MC-MMAF siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

#### **Ejemplo 6**

##### **Preparación de trastuzumab-MC-VAL-CIT-PAB-MMAE mediante conjugación de trastuzumab y MC-VAL-CIT-PAB-MMAE**

50

Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE se preparó mediante conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAE siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

#### **Ejemplo 7**

##### **Preparación de trastuzumab-MC-VAL-CIT-PAB-MMAF mediante conjugación de trastuzumab y MC-VAL-CIT-PAB-MMAF**

60

Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF se preparó mediante conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAF ("Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", N° de serie de EE.UU. 10/983,340, presentado el 5 de noviembre de 2004) y el procedimiento del Ejemplo 4.

**Ejemplo 8****Estudio de farmacocinética de trastuzumab-MC-VAL-CIT-PAB-MMAE en ratas**

- 5 A cada una de cuarenta y dos ratas Sprague-Dawley hembras (75-80 gramos cada una) se administró vehículo (Grupo 1), el conjugado de anticuerpo-fármaco trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (Grupos 2-6), o fármaco libre, monometilvalina auristatina, MMAE (Grupo 7). Los grupos 2 y 3 recibieron una preparación de Tr-MC-val-cit-PAB-MMAE con la carga promedio de fármaco de 8,7 MMAE/Tr. Los grupos 4, 5 y 6 recibieron una preparación de Tr-MC-val-cit-PAB-MMAE con la carga promedio de fármaco de 5,3 MMAE/Tr. Las dosis de ADC se ajustaron para liberar una exposición comparable al resto de fármaco, es decir, los Grupos 2 y 4 (840 µg de MMAE/m<sup>2</sup>), y los grupos 3 y 5 (2105 µg de MMAE/m<sup>2</sup>). El grupo 6 recibió la dosis más alta de 4209 µg de MMAE/m<sup>2</sup>.

Grupo	Muestra administrada	mg/kg de ADC	µg de MMAE/m <sup>2</sup> *	MMAE/T r	N/sexo
1	Vehículo (PBS)	0	0	0	6/F
2	Tr-MC-val-cit-PAB-MMAE	5,0	841	8,7	6/F
3	Tr-MC-val-cit-PAB-MMAE	12,5	2103	8,7	6/F
4	Tr-MC-val-cit-PAB-MMAE	8,06	840	5,3	6/F
5	Tr-MC-val-cit-PAB-MMAE	20,2	2105	5,3	6/F
6	Tr-MC-val-cit-PAB-MMAE	40,4	4209	5,3	6/F
7	Free MMAE	0,206	840	NA	6/F

\*Área de superficie corporal calculada utilizando MW 718 MMAE y MW 145167 trastuzumab, y del siguiente modo:  $\left[\frac{\text{peso corporal en gramos} \times 0,667 \text{ de potencia}}{11,8}\right] / 10000$

- 15 Las soluciones de dosis se administraron mediante un único bolo intravenoso en inyección en la vena de la cola el día de Estudio 1 en un volumen de dosis de 10 ml/kg. Todas las soluciones de dosis estaban dentro del 10 % de la concentración prevista. Los pesos corporales de los animales se midieron antes de la dosis el Día de Estudio 1 y diariamente a partir de entonces. Se recogió sangre completa en tubos que contienen EDTA para los parámetros de hematología y hemogramas completos. La sangre enterase recogió en tubos separadores de suero para los parámetros de química clínica. Las muestras de sangre se obtuvieron antes de la dosis el Día de Estudio 4, los días del estudio 3 y 5. La sangre entera también se recogió en tubos que contienen heparina de litio y el plasma se congeló a -70 °C para su posterior análisis.

- 25 Todos los animales en los grupos de dosis de 1,2, 3, 4, 5 y 7 parecían sanos a lo largo de los 5 días en el estudio. Dos animales del Grupo 6 recibieron 40,4 mg/kg de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE (5,3, cisteína) fueron encontrados muertos el Día 4 del estudio. Los 4 animales restantes de ese grupo estaban moribundos (letargo y secreciones amarillas en la zona urogenital) y fueron sacrificados y se les realizó la necropsia el día 4. A los animales en los grupos 2, 4, y 7 se les administró cantidades comparables de MMAE (840 µg/m<sup>2</sup>) y tenían cambios comparables en el peso corporal.

- 30 Los animales a los que se administró cantidades más altas de MMAE (2,105 µg/m<sup>2</sup>) en el grupo de dosis 3 que recibieron 12,5 mg/kg de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE (8,7 fármacos/anticuerpo) y el grupo de dosis 5 que recibieron 20,2 mg/kg de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE (5,3 fármacos/anticuerpo) sí presentaron cambios significativamente diferentes en el peso corporal al 5º día ( $p < 0,05$ ).

**Ejemplo 9****Estudio de farmacocinética de trastuzumab-MC-VAL-CIT-PAB-MMAF en ratas**

- 40 Ratas Sprague-Dawley hembras (75-80 gramos cada una) recibieron cada una forma aislada en HPLC del conjugado de anticuerpo-fármaco trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF (Grupos 1, 2, 3), o anticuerpo no conjugado desnudo trastuzumab (Grupo 4). Las ratas de grupo 1 recibieron 2 conjugados fármaco/Ab purificados por HPLC. Las ratas de grupo 1 recibieron 4 conjugados fármaco/Ab purificados por HPLC. Las ratas de grupo 1 recibieron 6 conjugados fármaco/Ab purificados por HPLC. Cada rata recibió una sola inyección en bolo a tiempo 0.

Grupo	Muestra administrada	mg/kg de ADC	MMAF/Tr	N
1	Tr-MC-val-cit-PAB-MMAF	2,0	2	4
2	Tr-MC-val-cit-PAB-MMAF	2,0	4	4
3	Tr-MC-val-cit-PAB-MMAF	2,0	6	4
4	Tr (trastuzumab, rhu4D5)	2,0	0	4

- 45 Se obtuvo sangre (0,2 ml) a los siguientes puntos de tiempo: Grupos 1-4: 0, 3 min 1,6 y 24 h y 2, 3, 4, 8, 11, 14, 21, 28 días después de la dosis. Las muestras de plasma se analizaron mediante la selección en membrana de

inmunoafinidad y el método de HPLC de fase inversa del Ejemplo 2. Los resultados farmacocinéticos se representan gráficamente en las Figuras 35 y 36.

**Ejemplo 10**

5

**Toxicidad/seguridad en macaco**

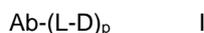
10

Similar a los estudios farmacocinéticos en ratas, se trató a los macacos con ADC, seguido de análisis de muestras de plasma, así como mediciones de enzimas hepáticas, y la inspección y análisis de los efectos en varios órganos. Las observaciones brutas incluyeron cambios en el peso corporal y signos de lesiones y sangrado. Los parámetros clínicos de patología (química sérica y hematología), histopatología y la necropsia se realizaron en animales que recibieron las dosis.

## REIVINDICACIONES

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

- 5 (i) procesar mediante selección con membrana de inmutafinidad una muestra biológica que se ha recogido de una fuente biológica en contacto previamente con un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I:



10 en la que

Ab es un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados a tumores o receptores de superficie celular;

D es un resto de fármaco seleccionado de un maitansinoide o de auristatina;

- 15 L es un enlazador unido covalentemente a Ab y unido covalentemente a D, en donde L se forma a partir de un reactivo enlazador seleccionado de 4-(2-piridiltio) propanoato de N-succinimidilo (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), o L se selecciona de maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP) y maleimidocaproil-valina-citrulina-para-aminobenciloxycarbonilo (MC-vc-PAB); y
- 20 p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

en el que una muestra de análisis se forma poniendo en contacto la muestra biológica con una membrana de inmutafinidad que comprende un antígeno inmovilizado y la elución de la muestra de análisis;

- 25 (ii) aplicar la muestra de análisis a un medio de separación para efectuar la separación de más de una muestra constituyente en donde un constituyente de la muestra separada comprende un fragmento de anticuerpo de un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I, o un fragmento de anticuerpo o metabolito del mismo, y en la que p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y

- 30 (iii) establecer la masa o la relación entre la masa y la carga y cuantificar uno o más constituyentes de la muestra separados que es un fragmento de anticuerpo o un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I o un metabolito del mismo, en donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, mediante espectrometría de masas con monitorización de ion único (SIM).

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

- 35 3. El método de la reivindicación 1, en el que la fuente biológica se selecciona de un mamífero, tejido y un cultivo celular.

4. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es sangre, bilis, orina o heces.

- 40 5. El método de la reivindicación 4, en el que la muestra biológica es sangre y la sangre se procesa para formar plasma o suero.

6. El método de la reivindicación 3 en el que el mamífero se selecciona de un ratón, una rata, un perro, un mono y un ser humano.

- 45 7. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica se procesa adicionalmente mediante formulación, inmovilización, centrifugación, aislamiento, digestión, inducción o prevención de la coagulación de las células sanguíneas, hidrólisis o purificación de la muestra de análisis

- 50 8. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de análisis es un lisado celular, un lisado tisular o un lisado de órganos.

9. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de análisis se desnatura.

- 55 10. El método de la reivindicación 9, en el que la muestra de análisis se desnatura mediante un reactivo desnaturante seleccionado de formamida, dimetilformamida y acetónitrilo.

11. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de análisis se trata con un agente reductor.

- 60 12. El método de la reivindicación 11, en el que el agente reductor es DTT o TCEP.

13. El método de la reivindicación 1, en el que la membrana de inmutafinidad se selecciona de:

- 65 (i) poliestireno, vidrio de poro controlado, vidrio, gel de sílice, sílice, poliácridamida, poliácridato, hidroxietilmetacrilato, poliamida, polietileno, polietilenoxi, agarosa, dextrina, celulosa, así como sus copolímeros, sus mezclas y sus productos injertados.

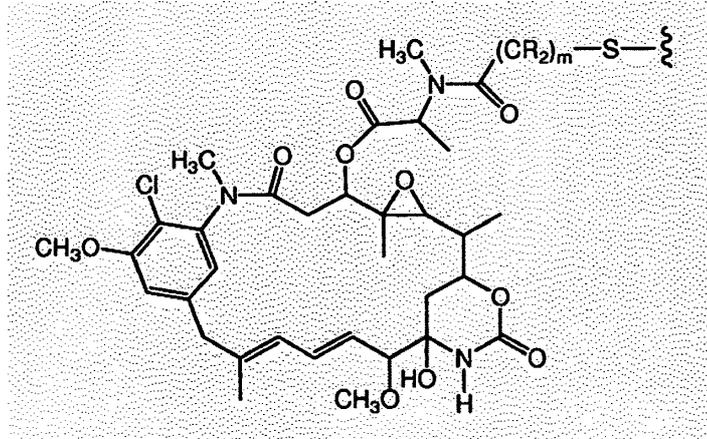
14. El método de la reivindicación 1, en el que la membrana de inmunoafinidad comprende grupos funcionales azolactam o un monolito de polímero poroso.
- 5 15. El método de la reivindicación 1, en el que la membrana de inmunoafinidad comprende al menos un canal de flujo continuo en comunicación fluida con un depósito de recogida.
- 10 16. El método de la reivindicación 15, en el que la membrana de inmunoafinidad está configurada en un recipiente de flujo continuo, en donde la muestra de la fuente biológica se introduce en un extremo u orificio, y una muestra se eluye en el otro extremo u orificio.
- 15 17. El método de la reivindicación 16, en el que la membrana de inmunoafinidad está distribuida en una pluralidad de recipientes de flujo continuo, cada uno en comunicación con un depósito de recogida separada.
18. El método de la reivindicación 17, en el que los vasos y 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.
- 20 19. El método de la reivindicación 1 que comprende además la etapa de tratar la muestra de análisis con un reactivo de desglicosilación.
20. El método de la reivindicación 19, en el que el reactivo de desglicosilación es PNGasaF.
- 25 21. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de análisis se aplica de forma intermitente a los medios de separación o se aplica de forma continua a los medios de separación.
22. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de separación es un soporte de cromatografía.
- 30 23. El método de la reivindicación 22, en el que el soporte de cromatografía es un adsorbente de fase inversa.
24. El método de la reivindicación 23 en el que la fase inversa es poliestireno, o un injerto o un copolímero de poliestireno.
- 35 25. El método de la reivindicación 22 en el que un efluente del soporte de cromatografía se analiza de forma intermitente por espectrometría de masas para establecer la relación masa a carga de más de uno de los constituyentes aclarados separados.
- 40 26. El método de la reivindicación 1, en el que un constituyente de la muestra comprende un fragmento de anticuerpo de cadena ligera o de cadena pesada.
27. El método de la reivindicación 26, en el que el fragmento de anticuerpo de cadena ligera o de cadena pesada comprende además uno o más restos de fármaco.
- 45 28. El método de la reivindicación 1, en el que Ab es un fragmento de anticuerpo.
29. El método de la reivindicación 28 en el que el fragmento de anticuerpo se selecciona de un fragmento Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>v</sub>, diacuerpo, anticuerpo lineal y molécula de anticuerpo de una sola cadena.
- 50 30. El método de la reivindicación 1, en el que Ab se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos humanizados huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8.
31. El método de la reivindicación 30, en del que Ab es anticuerpo humanizado huMAb4D5-8.
32. El método de la reivindicación 1, en el que Ab es un anticuerpo anti-ErbB2.
- 55 33. El método de la reivindicación 32, en el que Ab es un anticuerpo anti-ErbB2 que se une al epítipo 4D5.
34. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo del compuesto conjugado anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula I, o UN fragmento de anticuerpo o metabolito del mismo, se une a un antígeno asociado a tumor o un receptor de la superficie celular en la fuente biológica.
- 60 35. El método de la reivindicación 1 en el que anticuerpo del compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco se une a uno o más antígenos asociados a tumores o receptores de la superficie celular seleccionados de (1)-(35):
- 65 (1) BMPR1B (receptor de la proteína morfogenética ósea de tipo IB, N° de registro en Genbank NM\_001203);  
 (2) E16 (LAT1, SLC7A5, n° de registro en Genbank NM\_003486);  
 (3) STEAP1 (seis antígenos epiteliales transmembrana del la próstata, n° de registro en Genbank NM\_012449);

- (4) 0772P (CA125, MUC16, nº de registro en Genbank AF361486);
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina, nº de registro en Genbank NM\_005823);
- 5 (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, nº de registro en Genbank NM\_006424);
- (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 registro en Genbank AB040878);
- 10 (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN ADNc 2700050C12, RIKEN ADNc 2700050C12 gen, nº de registro en Genbank AY358628);
- (9) ETBR (receptor de tipo B de la endotelina; nº de registro en Genbank A275463);
- (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315); nº de registro en Genbank NM\_017763);
- 15 (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales transmembrana de la próstata 2, seis proteínas prostáticas transmembrana, nº de registro en Genbank AF455138);
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, potencial canal catiónico del receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, nº de registro en Genbank NM\_017636);
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, nº de registro en Genbank NP\_003203 o NM\_003212);
- 20 (14) CD21 (CR2 (receptor 2 del complemento) o C3DR (receptor C3d/del virus de Epstein Barr) o Hs 73792) nº de Registro en Genbank M26004);
- (15) CD79b (CD79B, CD79 $\beta$ , Igb (beta asociado a inmunoglobulina), B29, nº de registro en Genbank NM\_000626);
- 25 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, nº de registro en Genbank NM\_030764);
- (17) HER2 (nº de registro en Genbank M11730);
- (18) NCA (nº de registro en Genbank M18728);
- (19) MDP (nº de registro en Genbank BC017023);
- 30 (20) IL20R $\alpha$  (nº de registro en Genbank. AF184971);
- (21) Brevican (nº de registro en Genbank AF229053);
- (22) Ephb2R (nº de registro en Genbank NM\_004442);
- (23) ASLG659 (nº de registro en Genbank AX092328);
- (24) PSCA (nº de registro en Genbank AJ207436);
- (25) GEDA (nº de registro en Genbank AY260763);
- 35 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de células B, receptor BLYS 3, BR3, NP\_443177.1); y
- (27) CD22 (receptor de células B, isoforma CD22-B, NP-001762.1);
- (28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , 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, transduce una señal implicada en la diferenciación de las células B, nº de registro en Genbank NP\_001774.1);
- 40 (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, nº de registro en Genbank NP\_001707.1);
- (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+, nº de registro en Genbank NP\_002111.1);
- 45 (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 detrusor, nº de registro en Genbank NP\_002552.2);
- (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de las células B, Lyb-2, nº de registro en Genbank NP\_001773.1);
- 50 (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 la apoptosis de células B, la pérdida de función está asociada a un incremento de la actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico, nº de registro en Genbank NP\_005573.1);
- (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, nº de registro en Genbank NP\_443170.1); y
- 55 (35) IRTA2 (receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas asociado con la translocación, un inmunorreceptor 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, nº de registro en Genbank
- 60 NP\_112571.1).

36. El método de la reivindicación 1 en el que el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco había sido administrado a un mamífero en una dosis de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal.

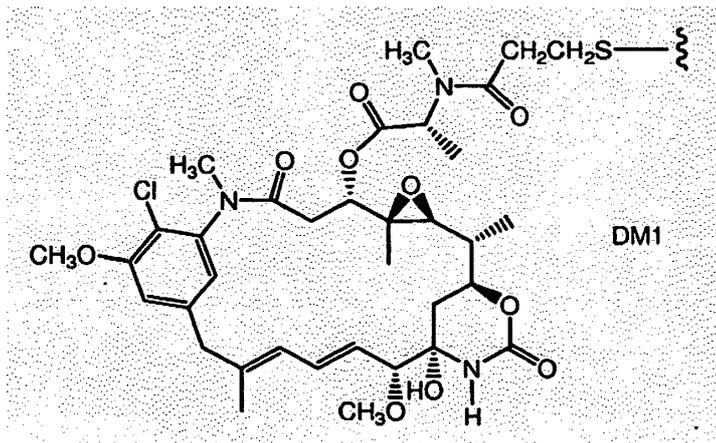
65 37. El método de la reivindicación 1, en el que L está unido covalentemente a un grupo amino, carboxilo o tiol de Ab.

38. El método de la reivindicación 1 en la 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 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

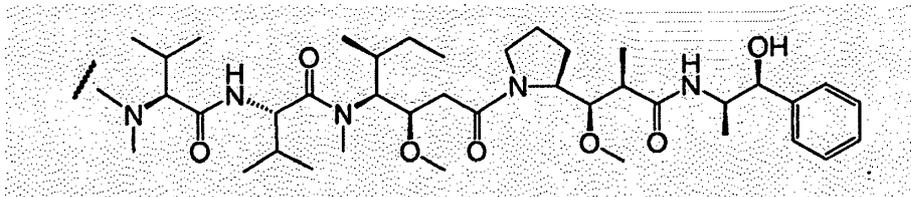
39. El método de la reivindicación 38, en el que D es DM1 que tiene la estructura:



10

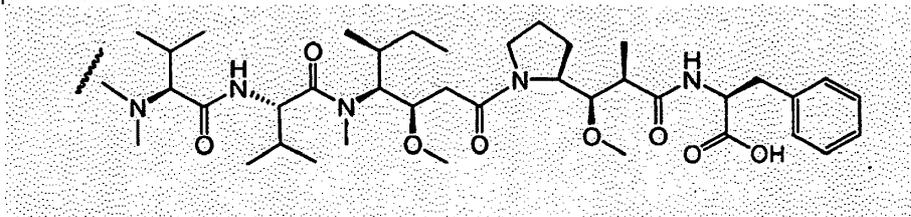
40. El método de la reivindicación 1, en el que D es una auristatina que es:

(i) MMAE, que tiene la estructura:



15

(ii) MMAF, que tiene la estructura:



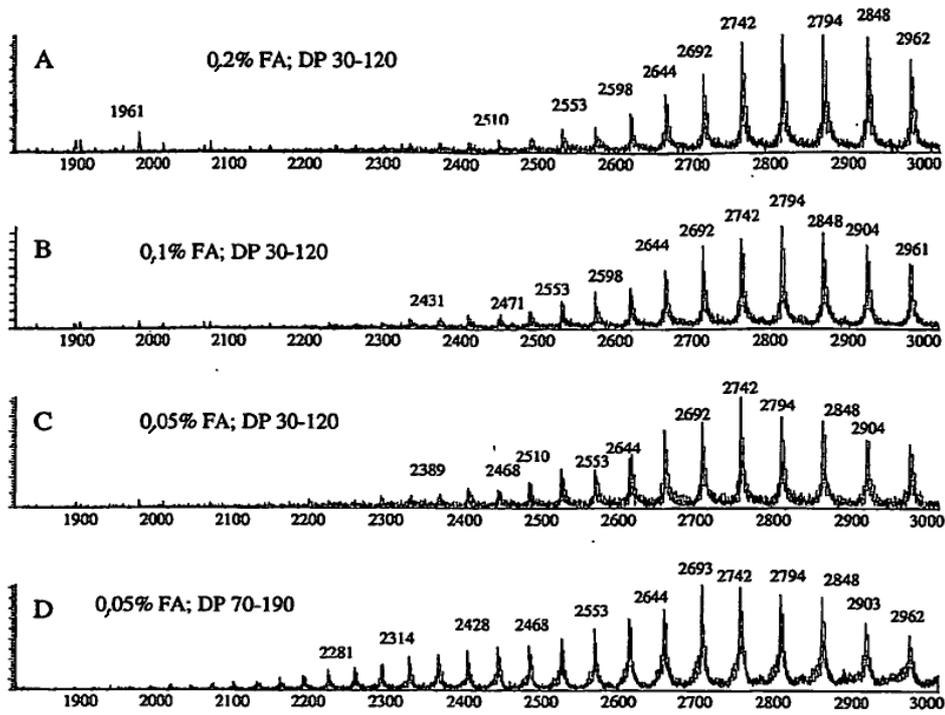


Figura 1

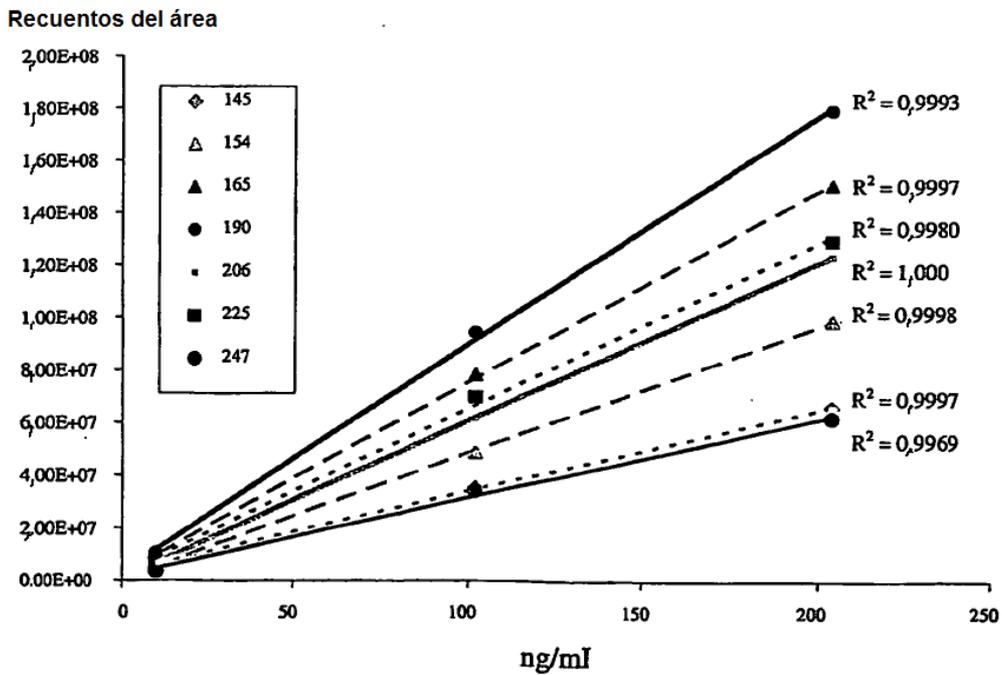


Figura 2

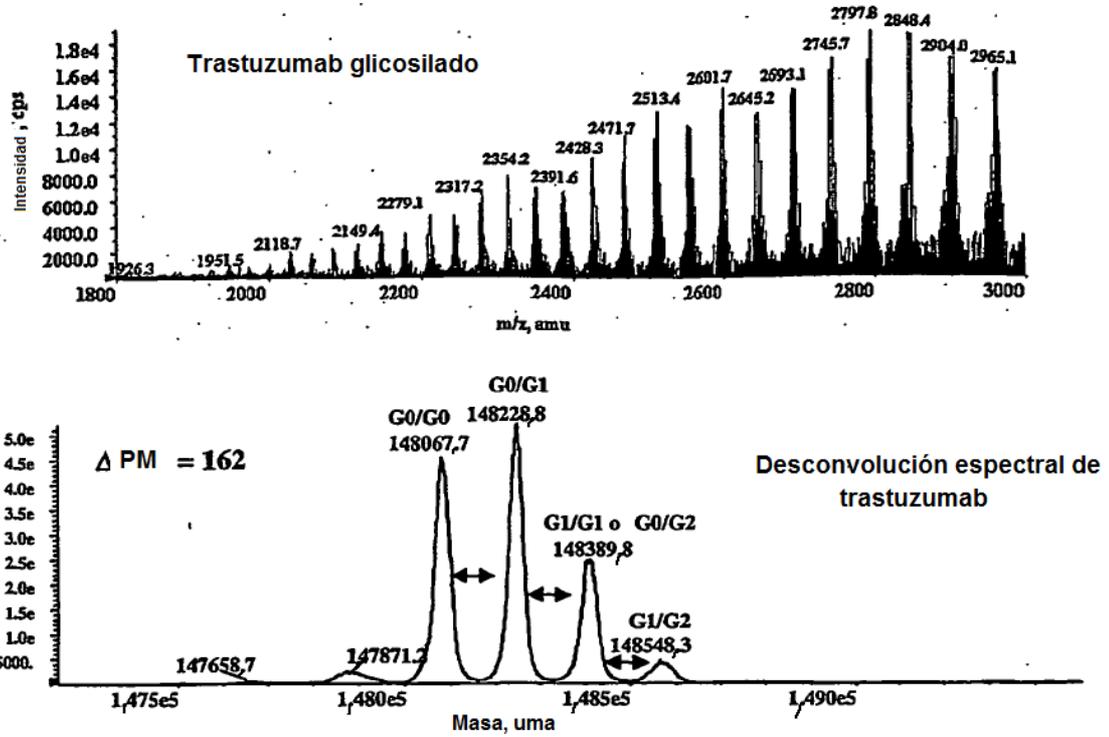


Figura 3

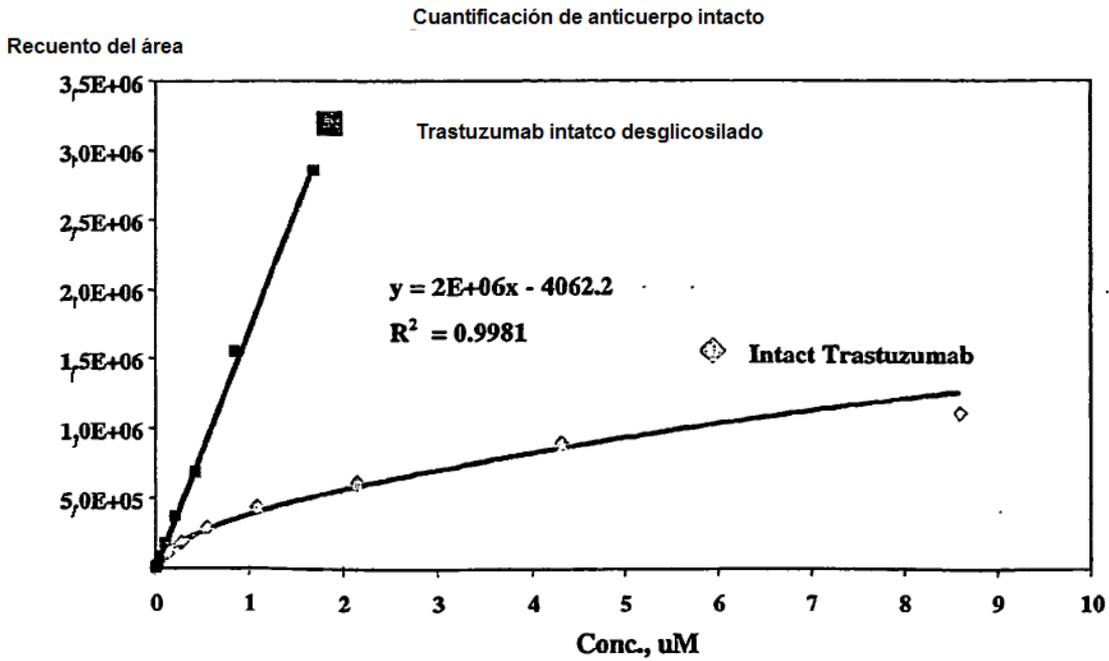


Figura 4

Cuantificación de trastuzumab reducido

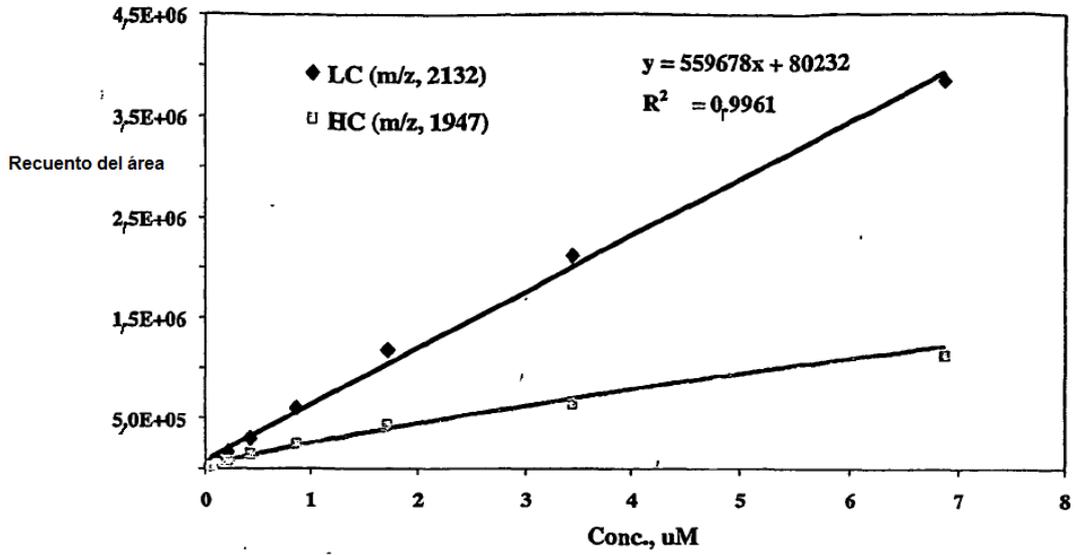


Figura 5

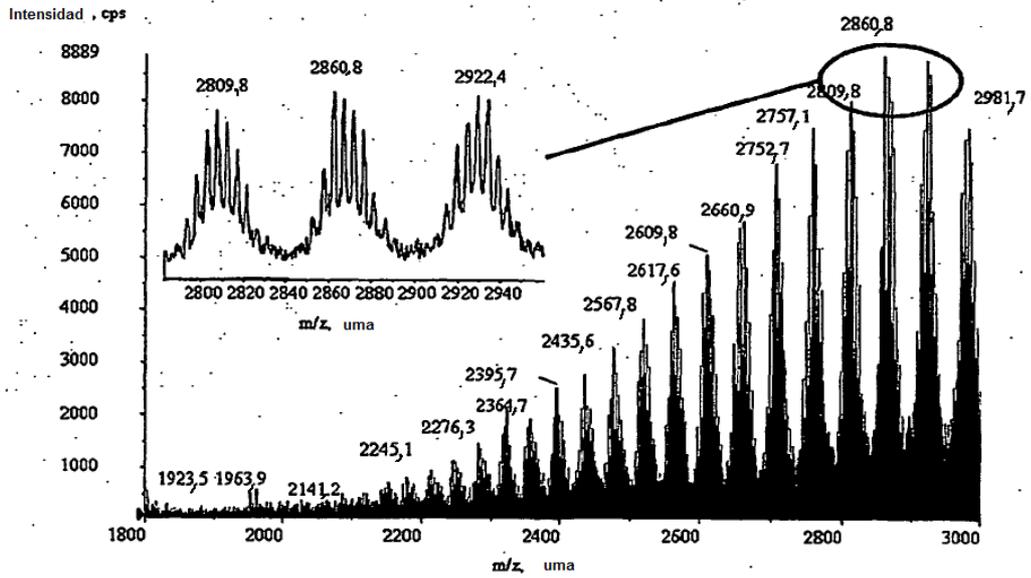


Figura 6

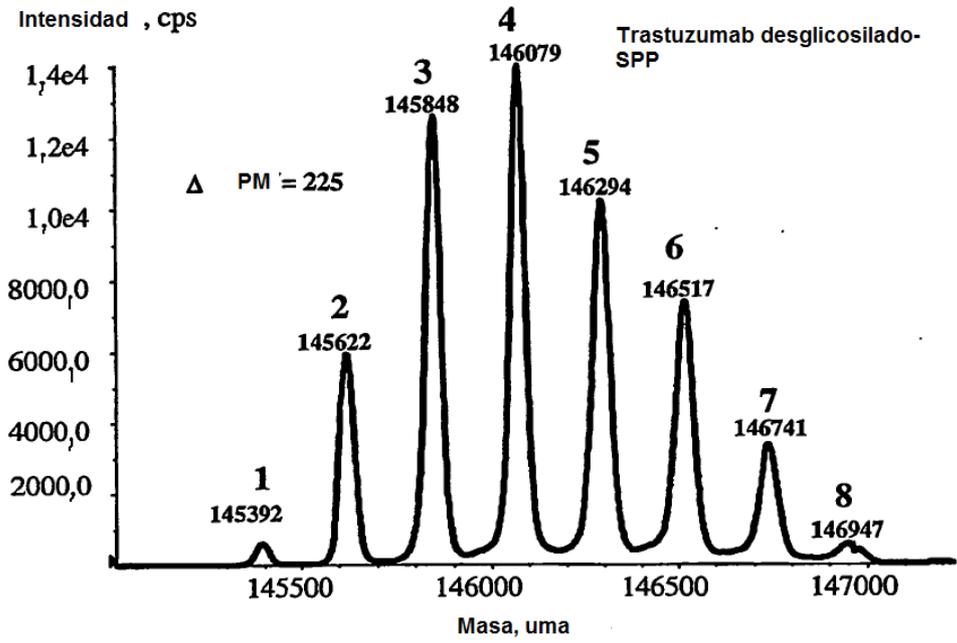


Figura 7

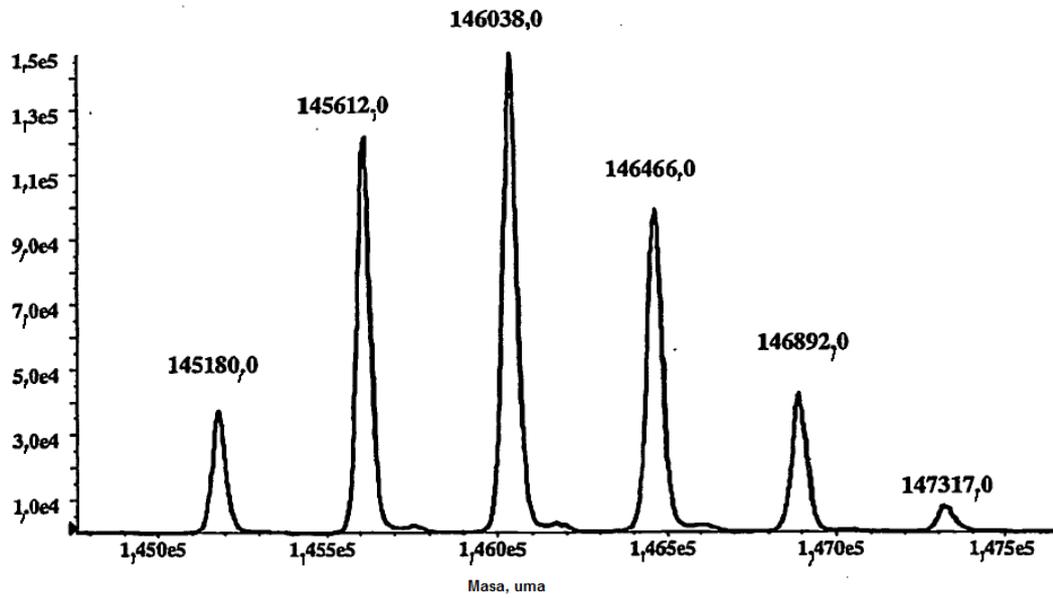


Figura 8

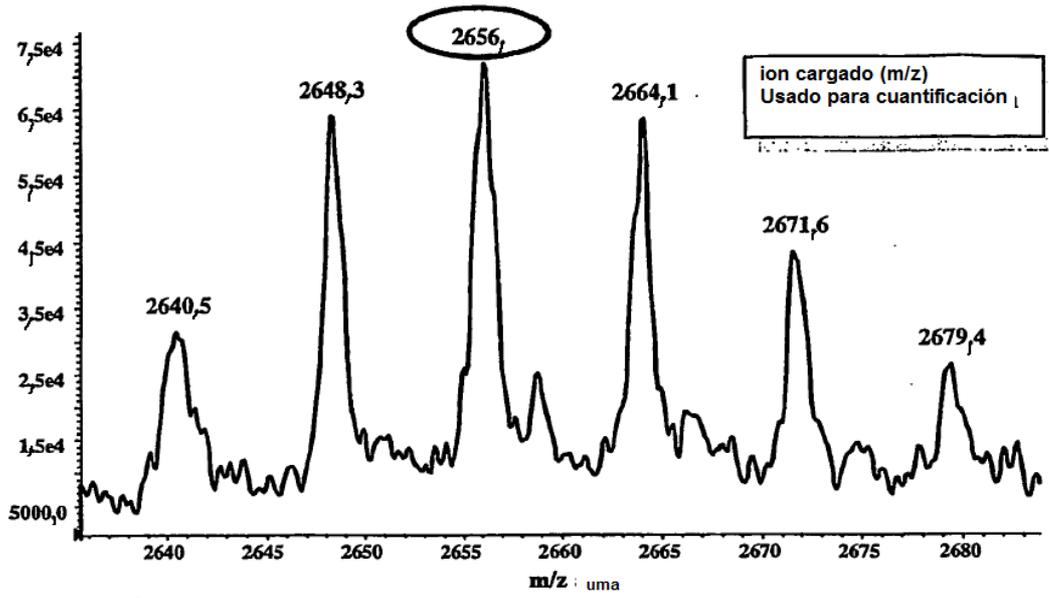


Figura 9

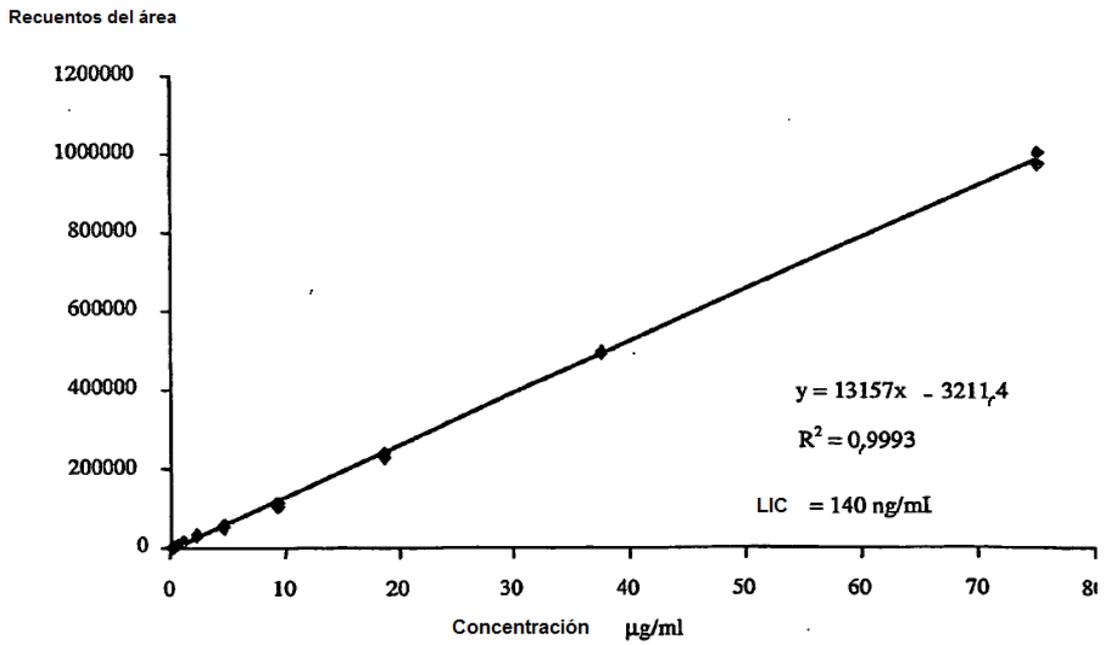


Figura 10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	% CV
A	401000	403000	364000	416000	370000	367000	420000	417000	377000	432000	402000	362000	6.3
B	426000	437000	446000	473000	424000	443000	456000	403000	445000	431000	413000	424000	4.4
C	423000	438000	417000	406000	386000	426000	386000	391000	427000	401000	393000	377000	4.9
D	416000	403000	413000	387000	421000	363000	368000	417000	415000	403000	387000	382000	5.0
E	406000	401000	370000	421000	397000	403000	401000	416000	384000	384000	382000	355000	4.8
F	388000	393000	398000	378000	339000	420000	421000	398000	425000	390000	391000	345000	6.9
G	394000	384000	391000	385000	395000	433000	414000	387000	384000	393000	393000	418000	3.9
H	386000	382000	389000	374000	397000	397000	392000	393000	410000	408000	387000	378000	2.8
% CV	3,8	5,3	6,7	8,0	7,0	7,3	6,6	3,1	6,0	4,4	2,5	7,4	

Prom. = 399953  
 Desv.est. = 24119  
 % CV = 6,0

Figura 11

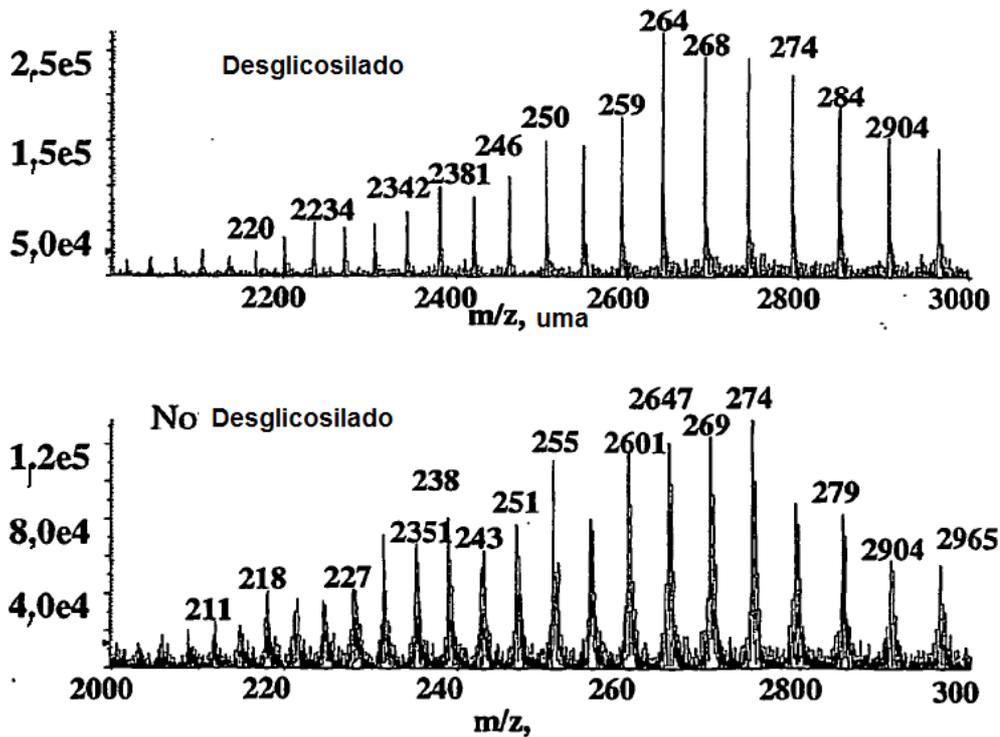


Figura 12

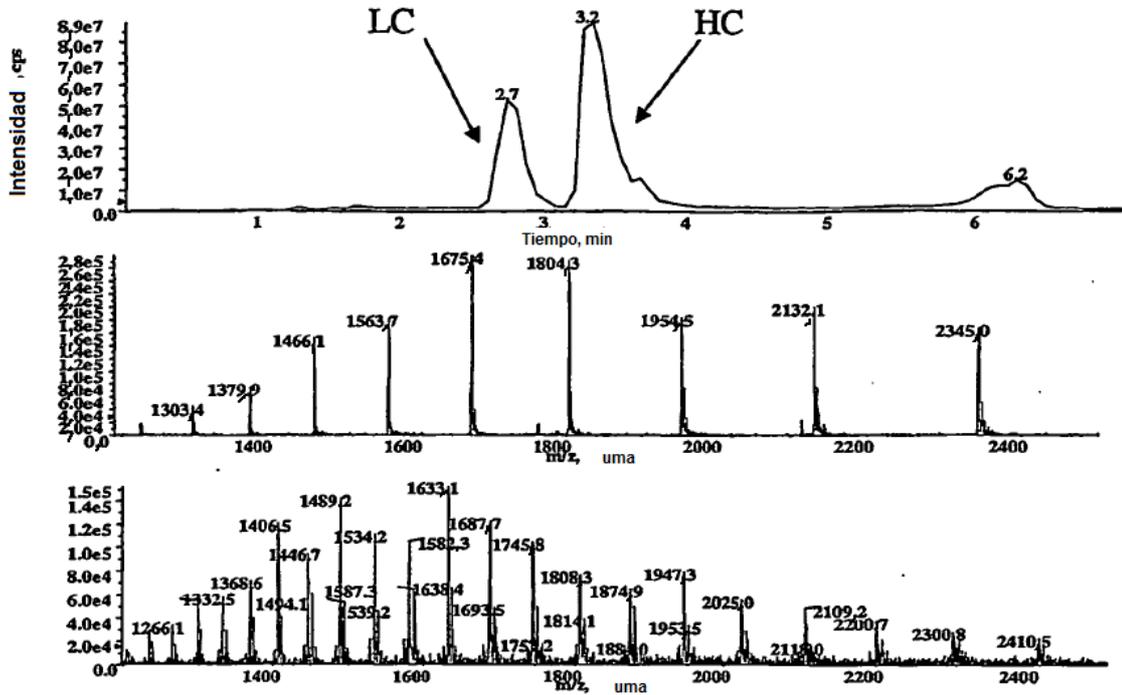


Figura 13

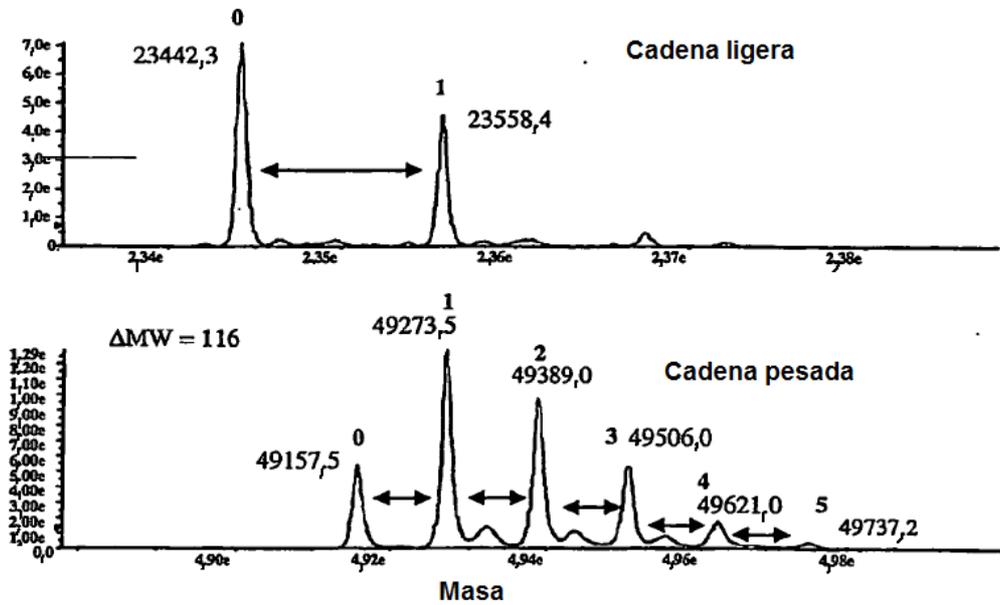


Figura 14

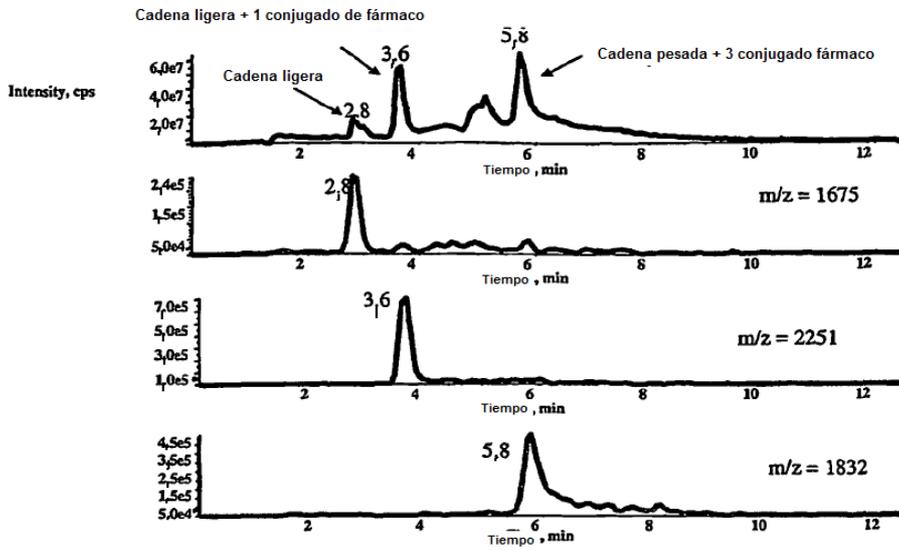


Figura 15

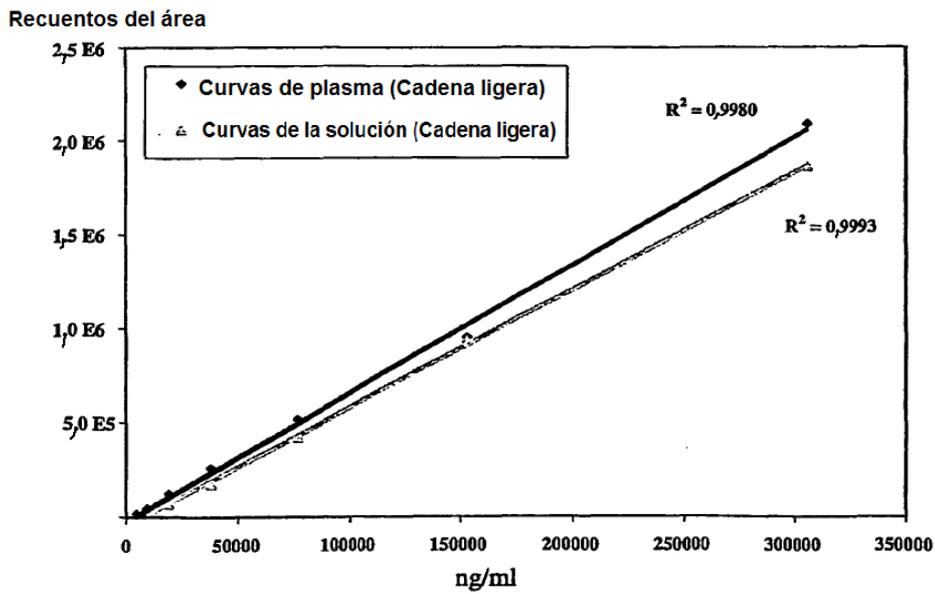


Figura 16

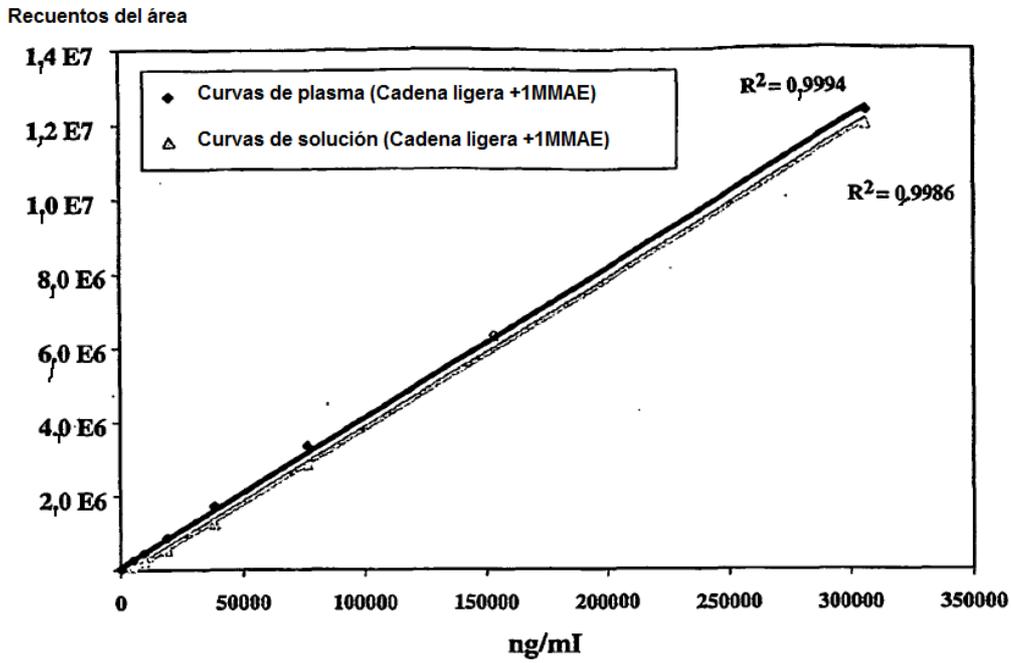


Figura 17

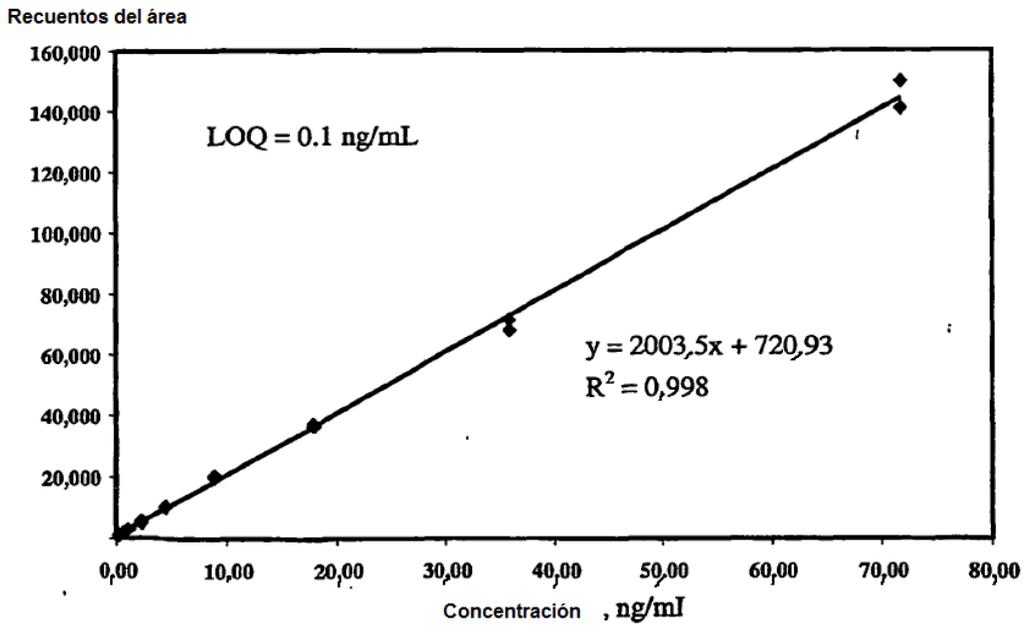


Figura 18

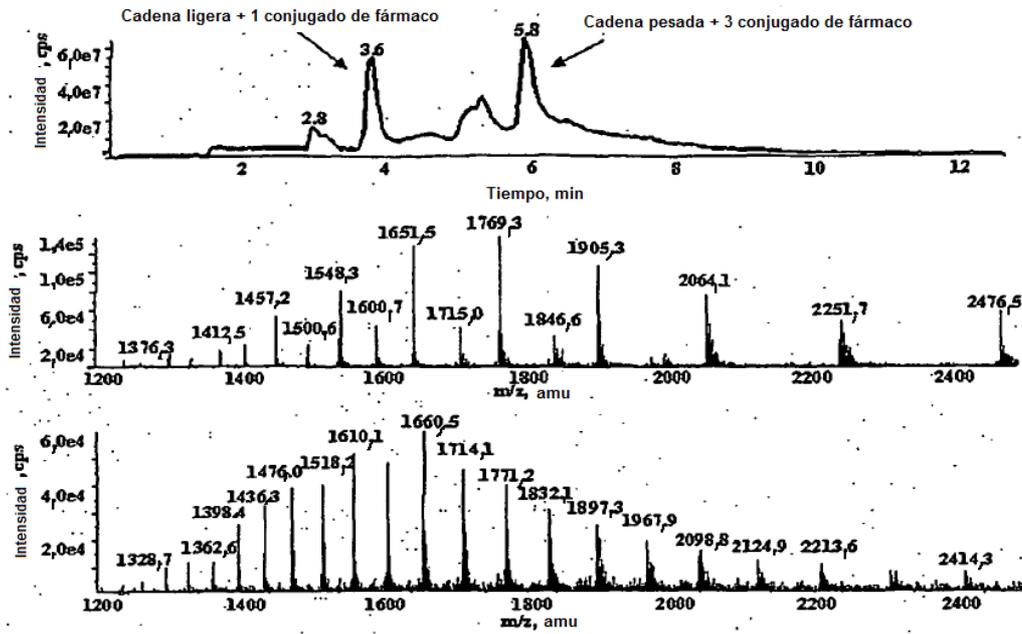


Figura 19

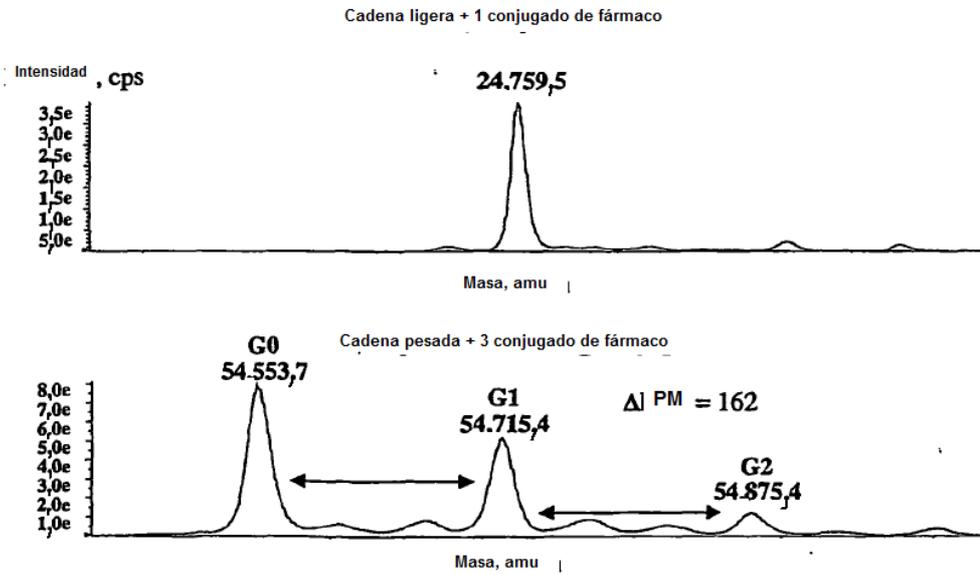


Figura 20

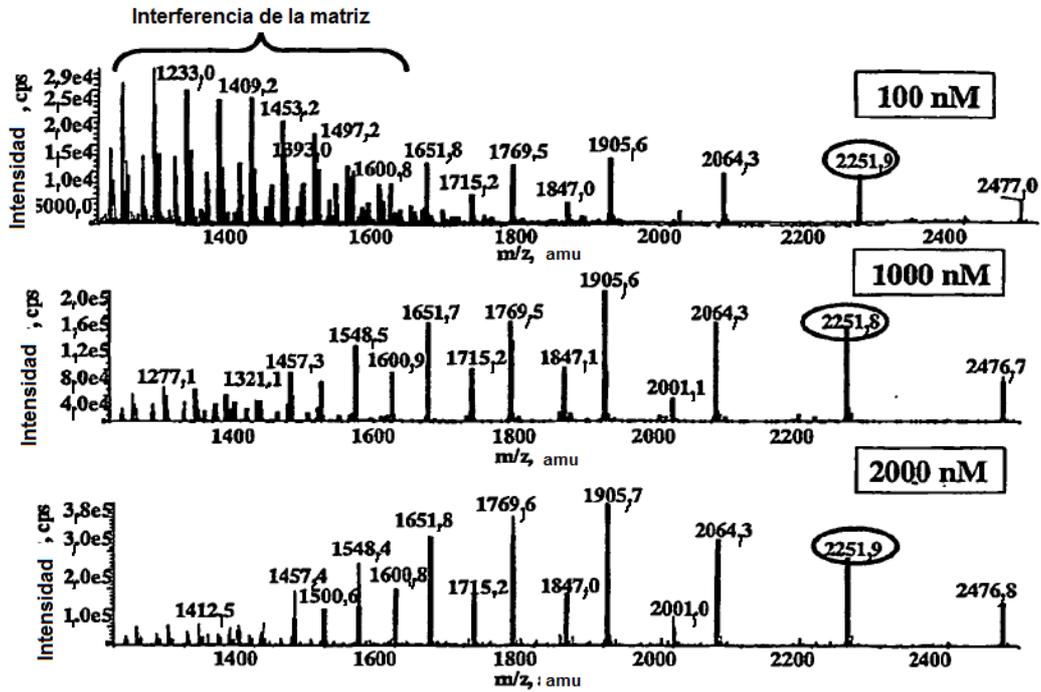


Figura 21

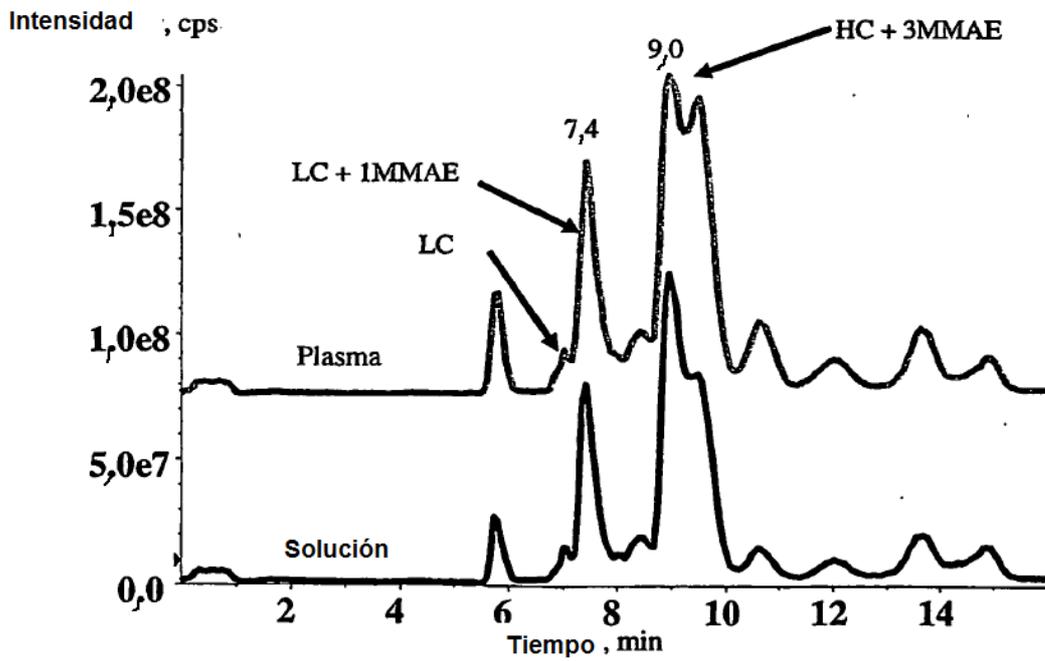


Figura 22

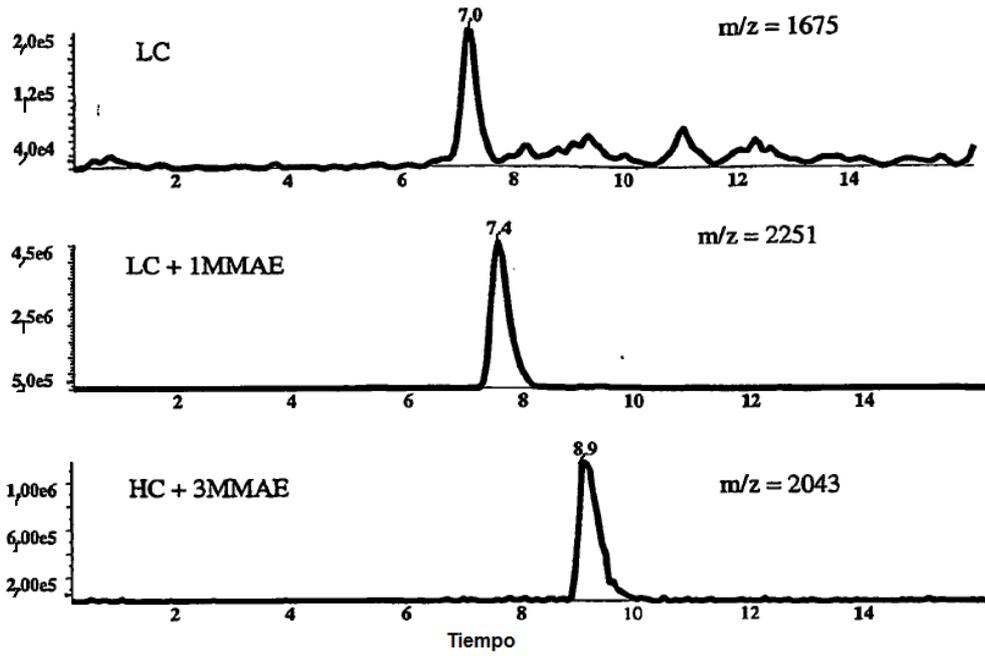


Figura 23

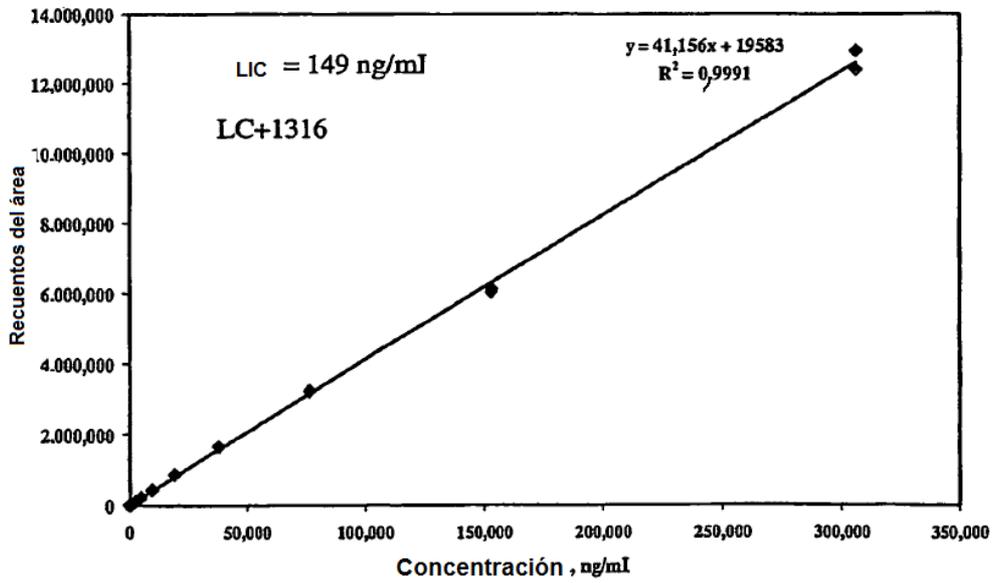


Figura 24

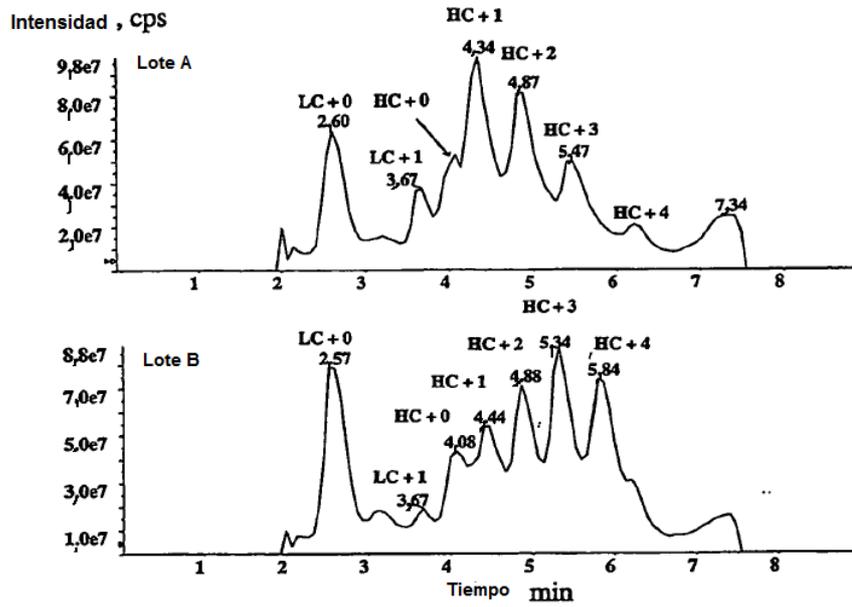


Figura 25

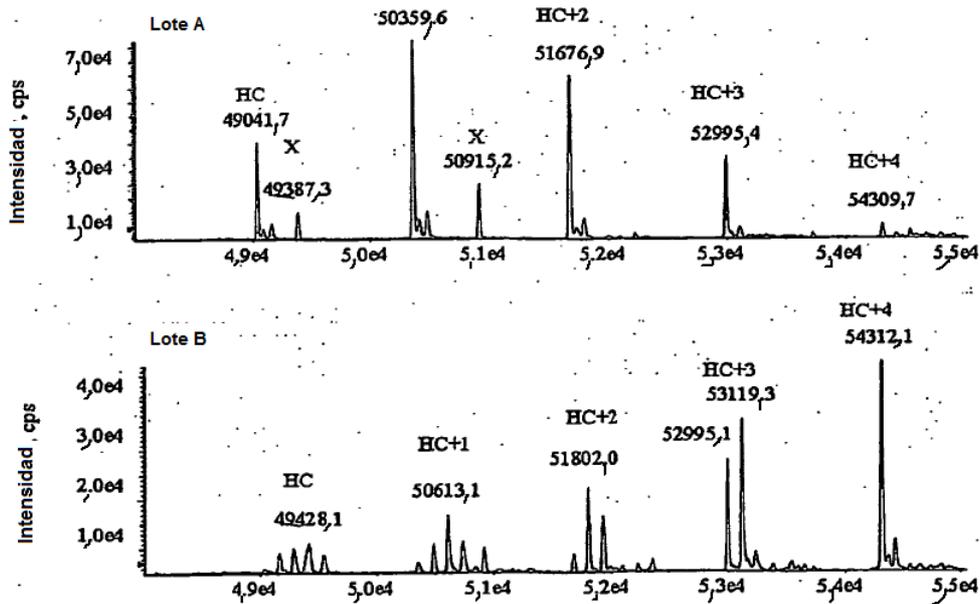


Figura 26

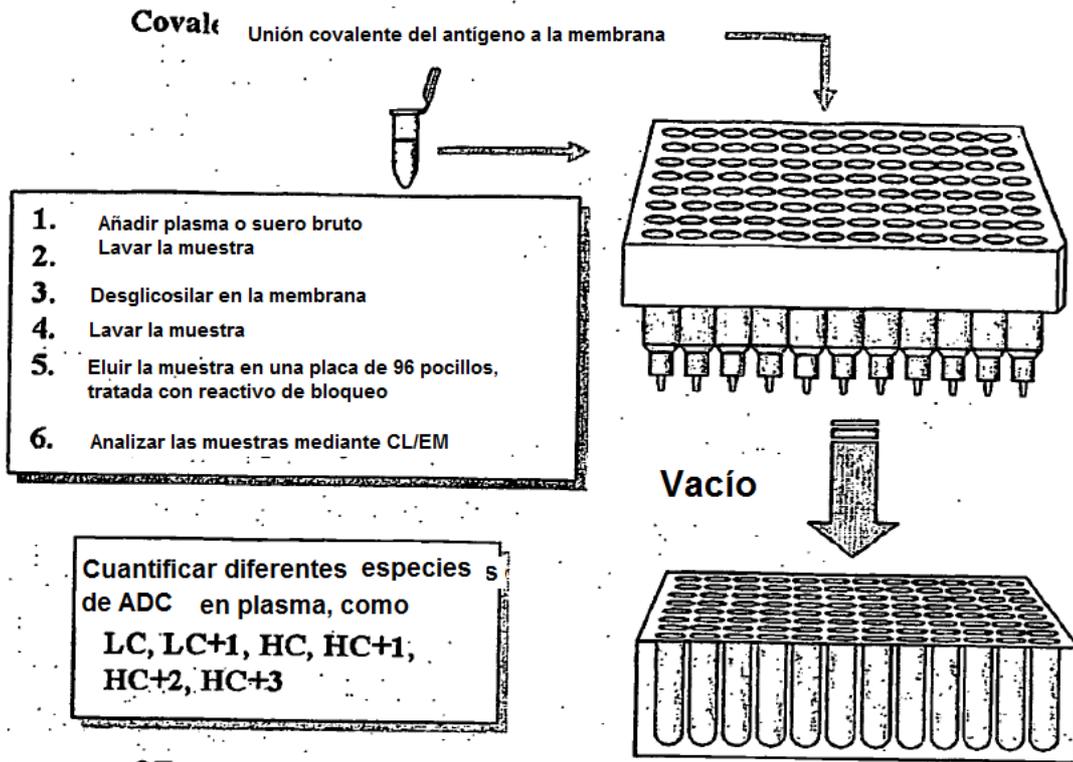


Figura 27

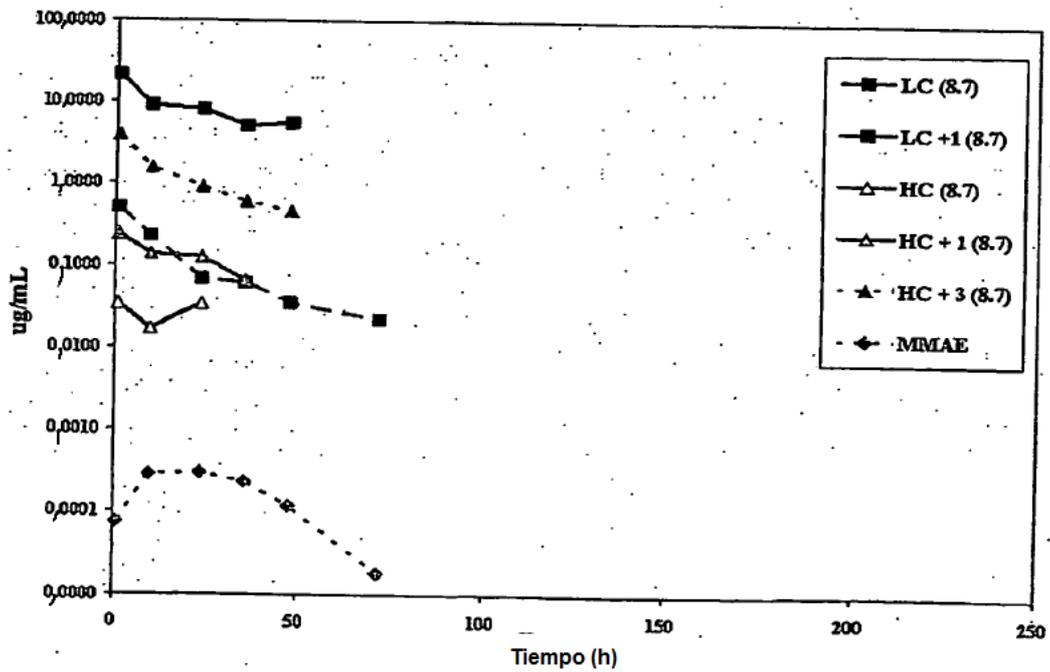


Figura 28

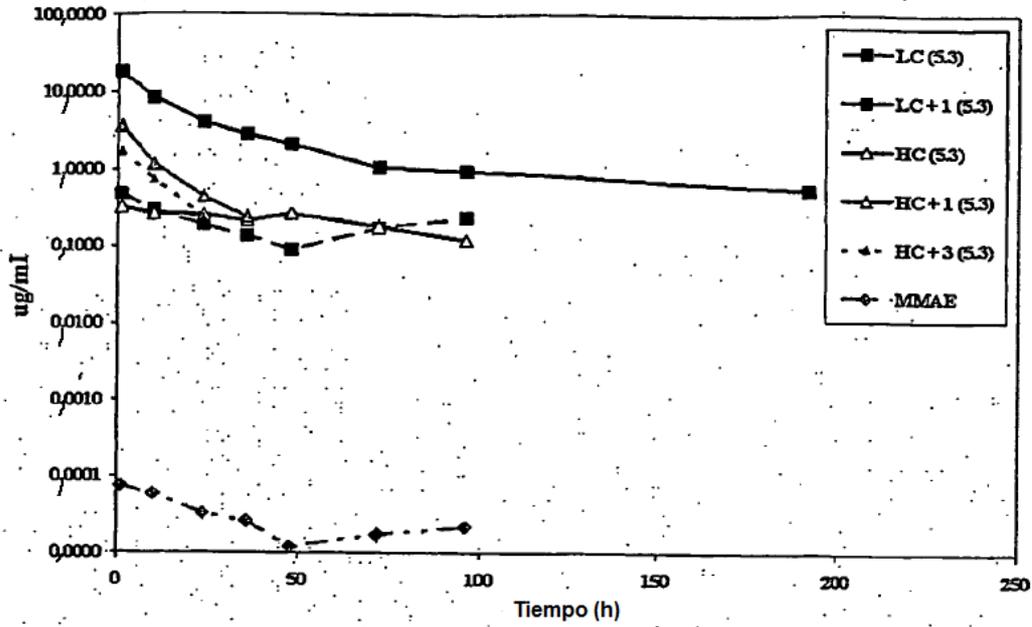


Figura 29

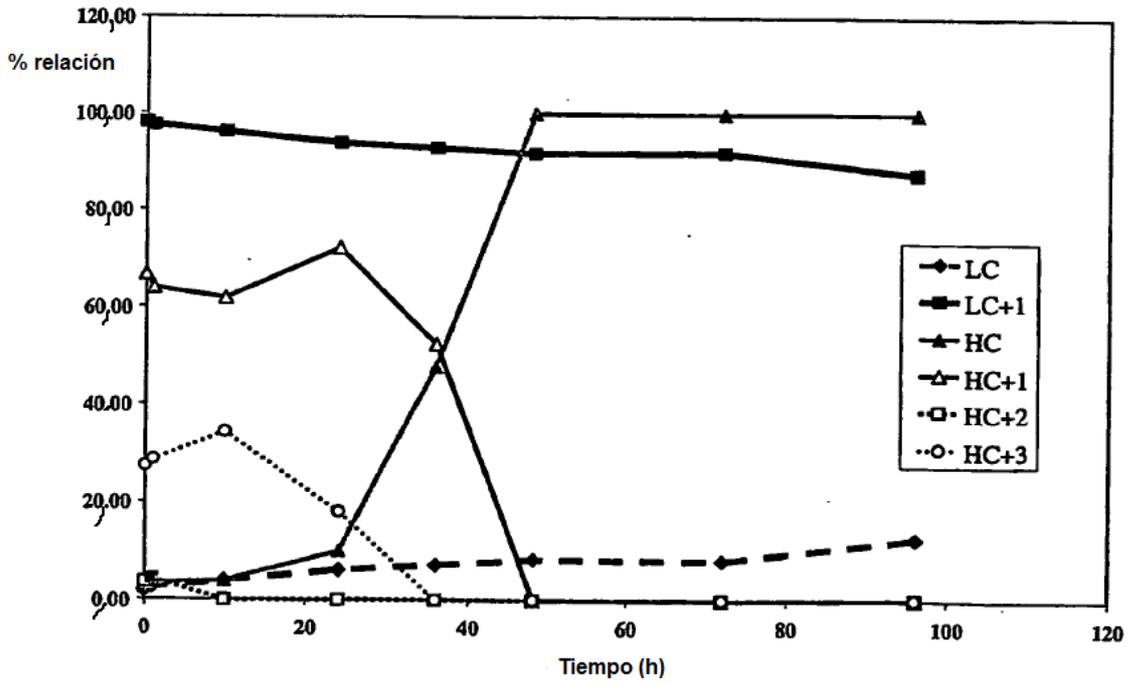


Figura 30

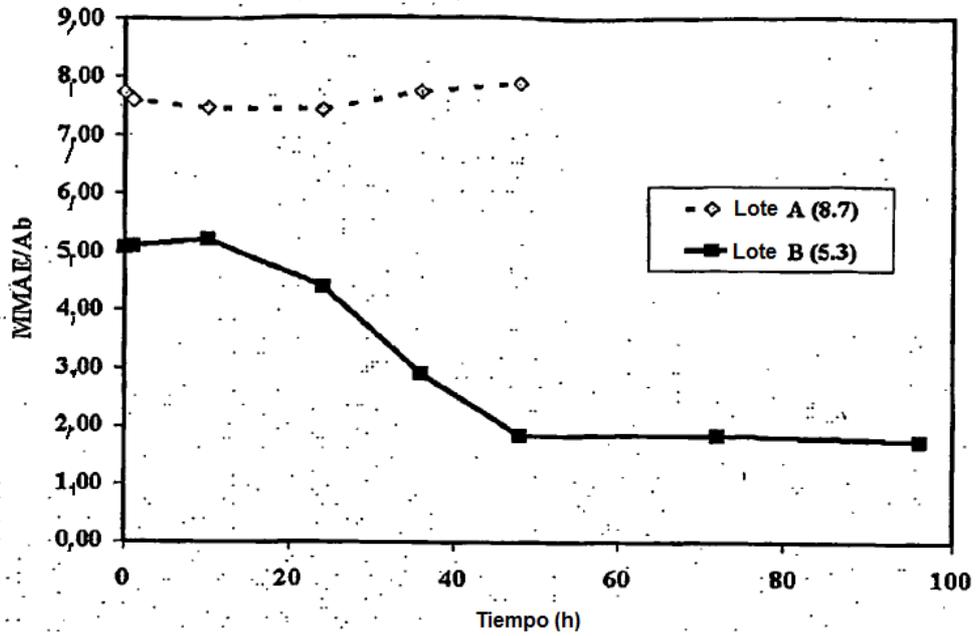


Figura 31

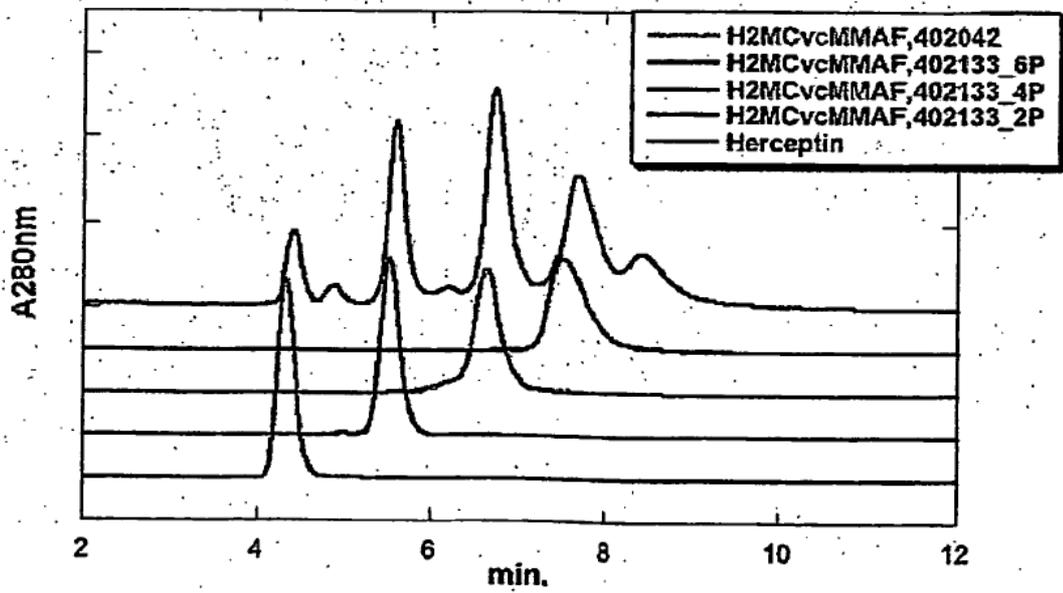


Figura 32

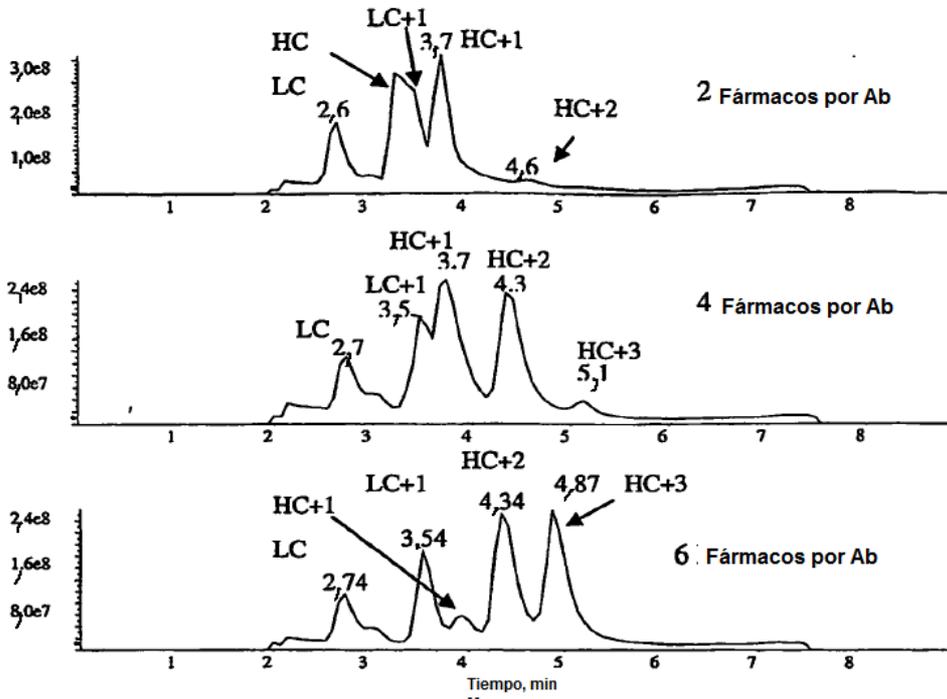


Figura 33

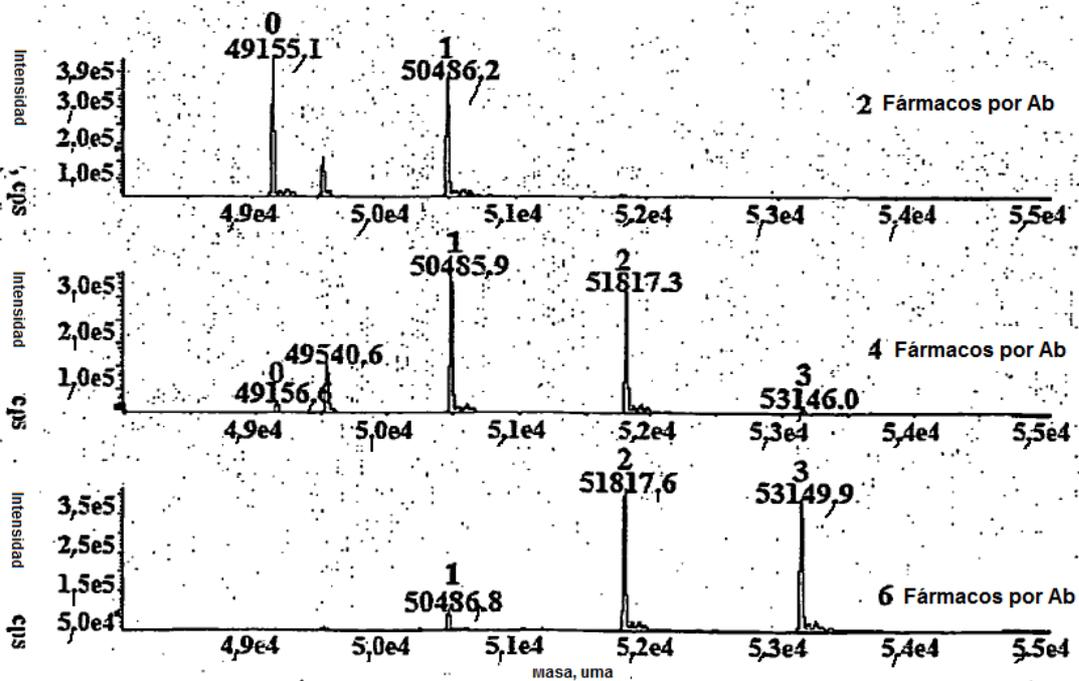


Figura 34

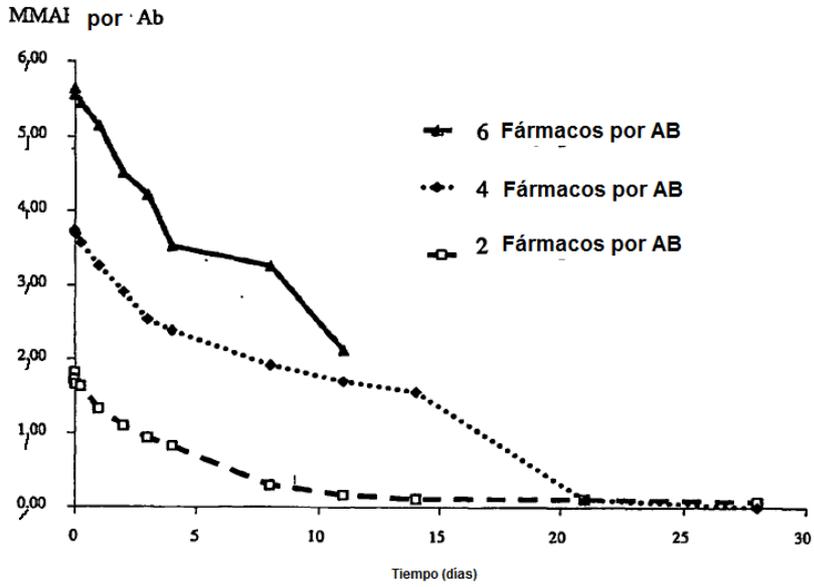


Figura 35

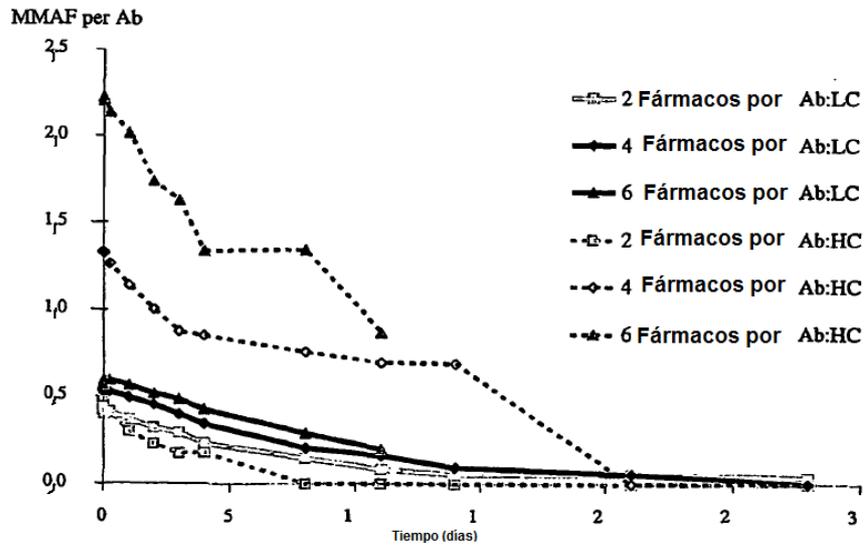


Figura 36

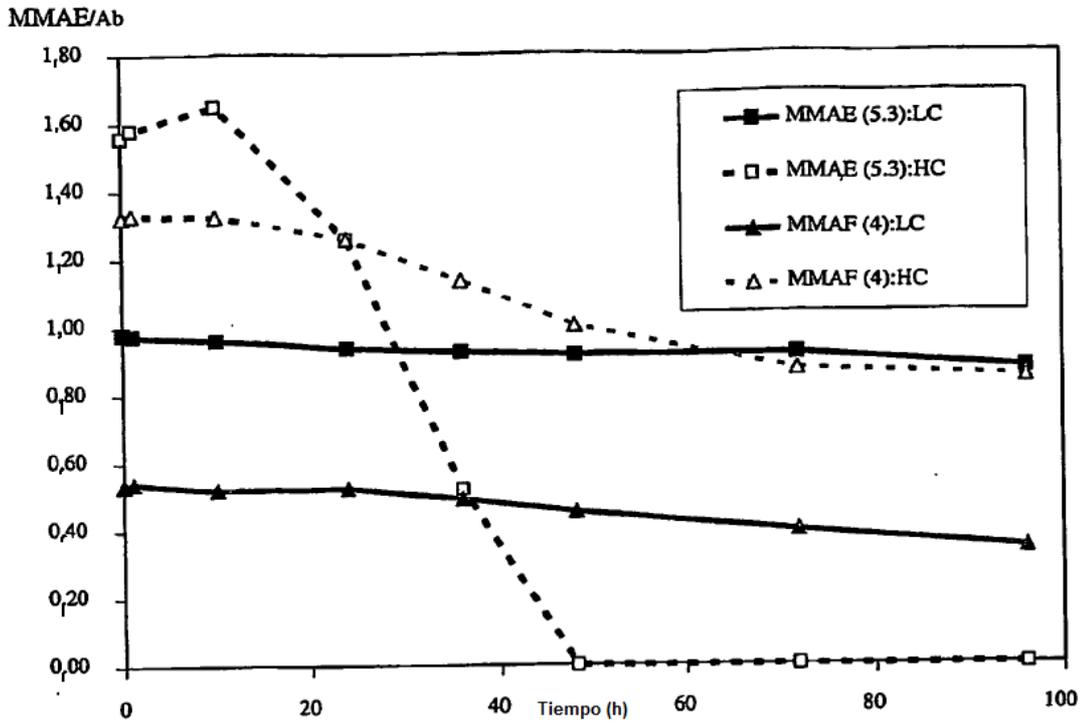


Figura 37

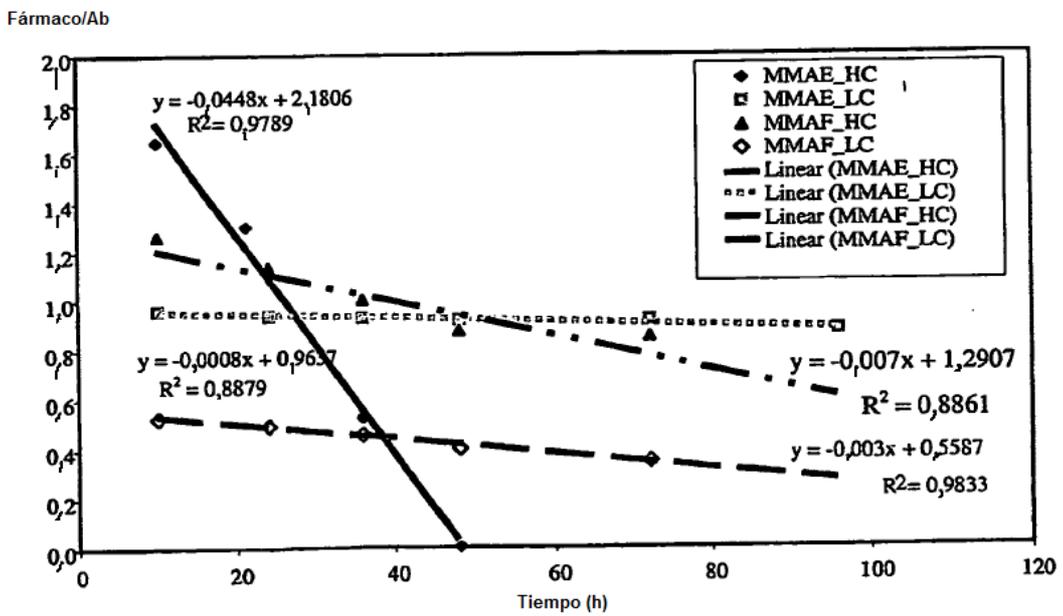


Figura 38

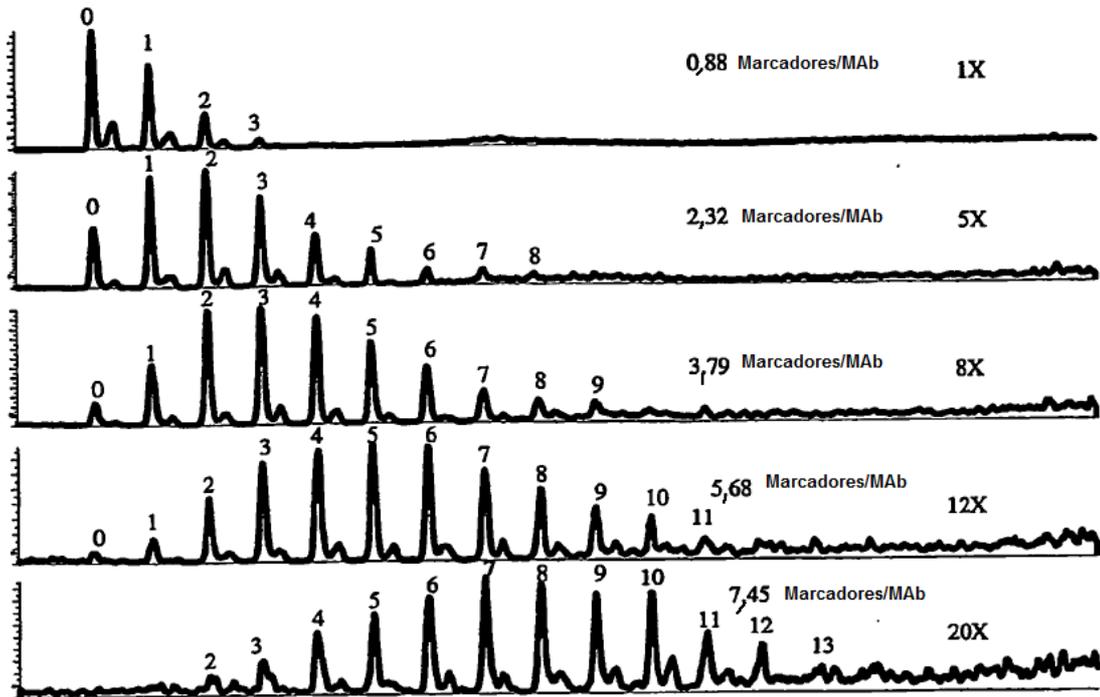


Figura 39

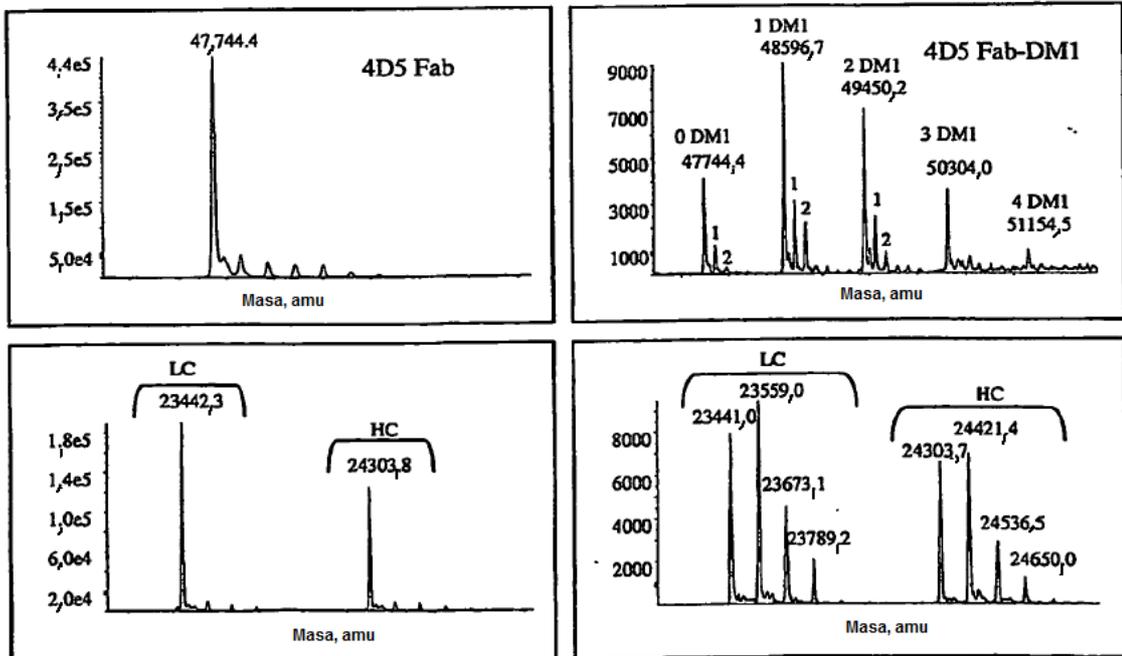


Figura 40

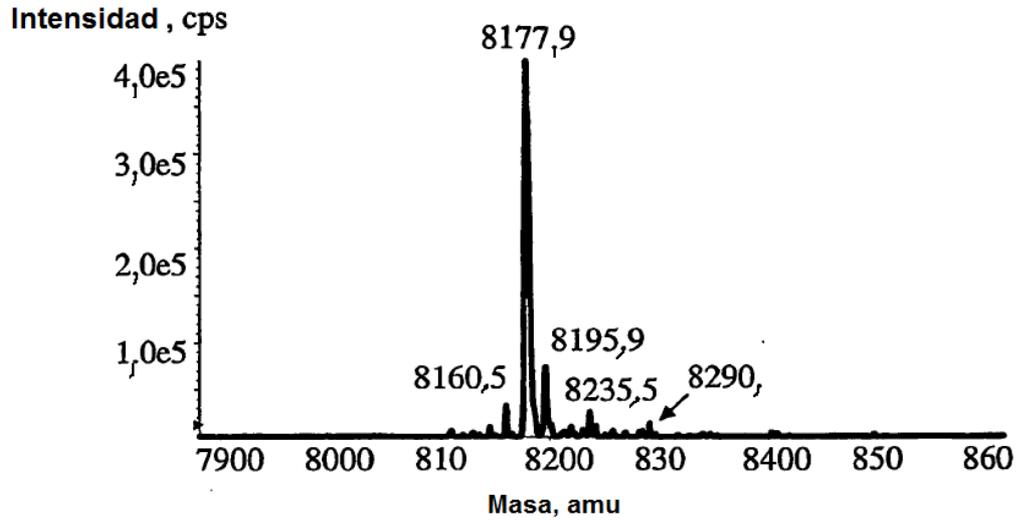


Figura 41

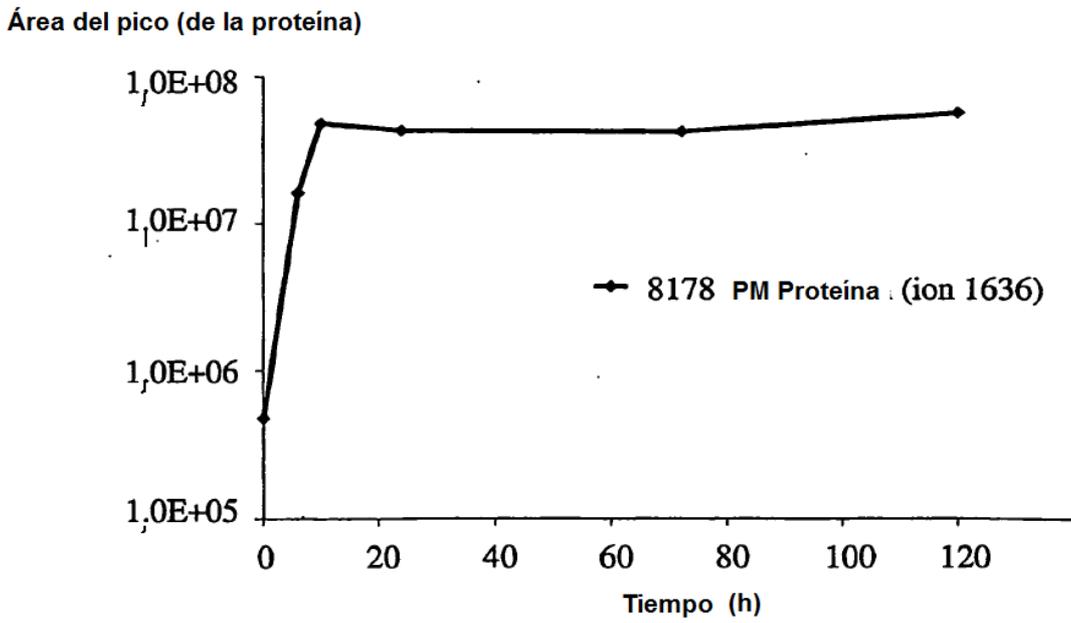


Figura 42

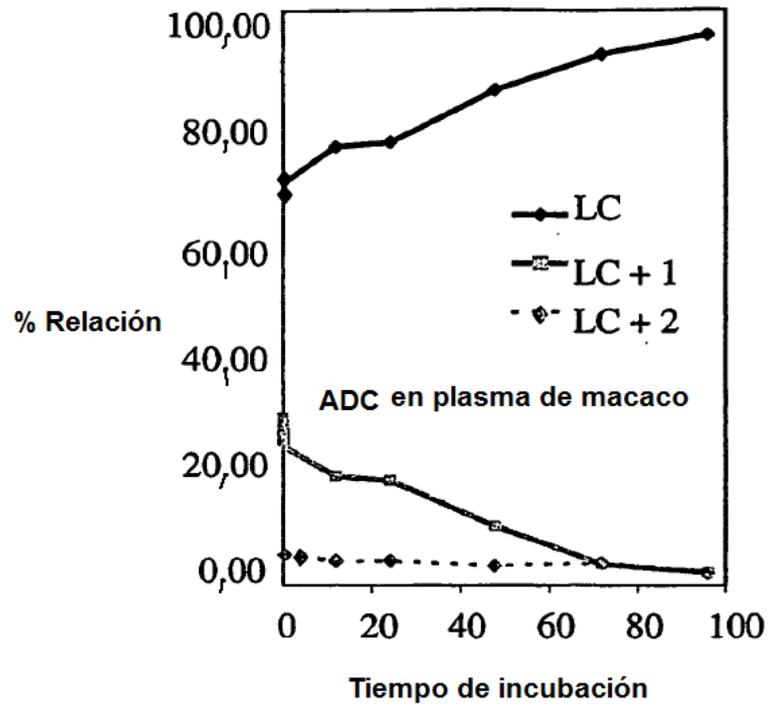


Figura 43

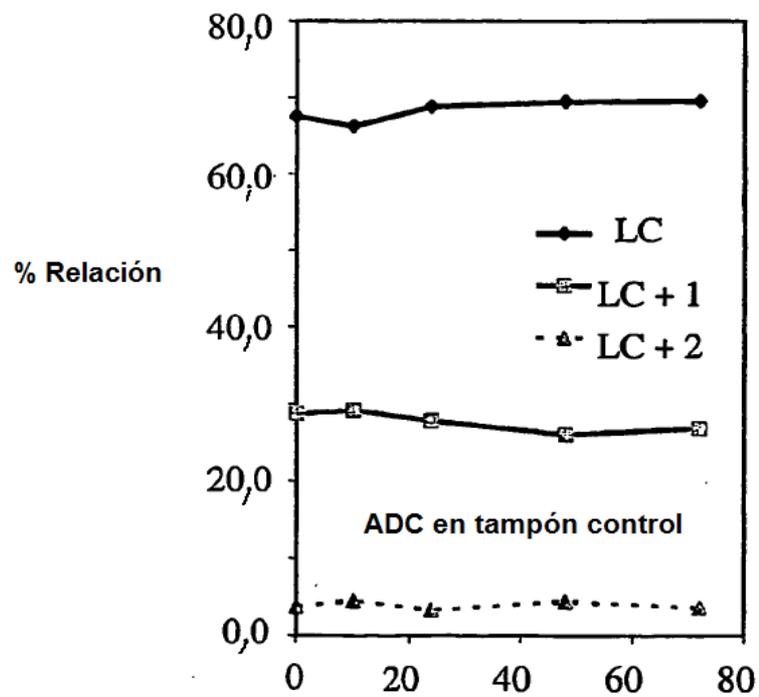


Figura 44

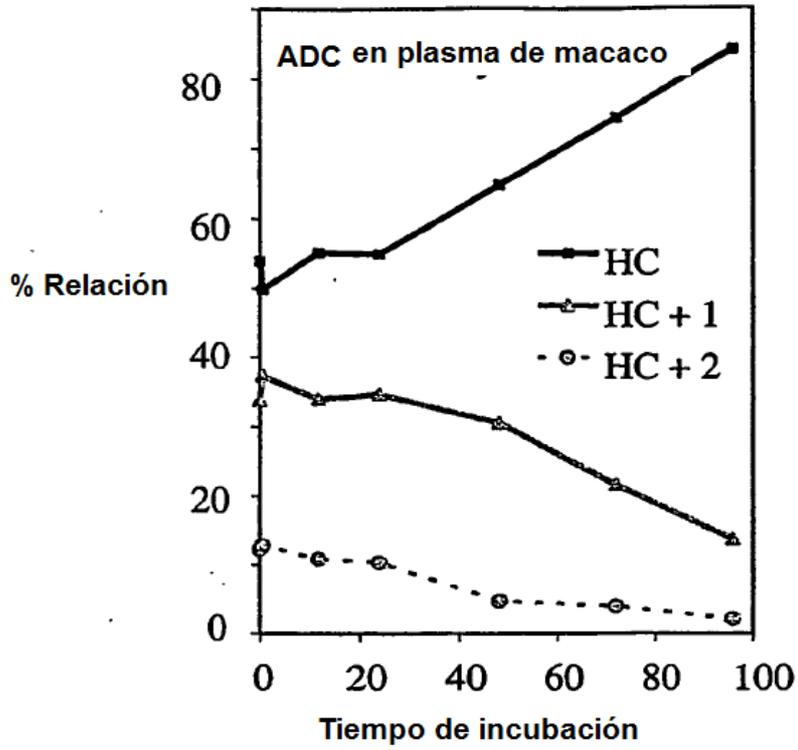


Figura 45

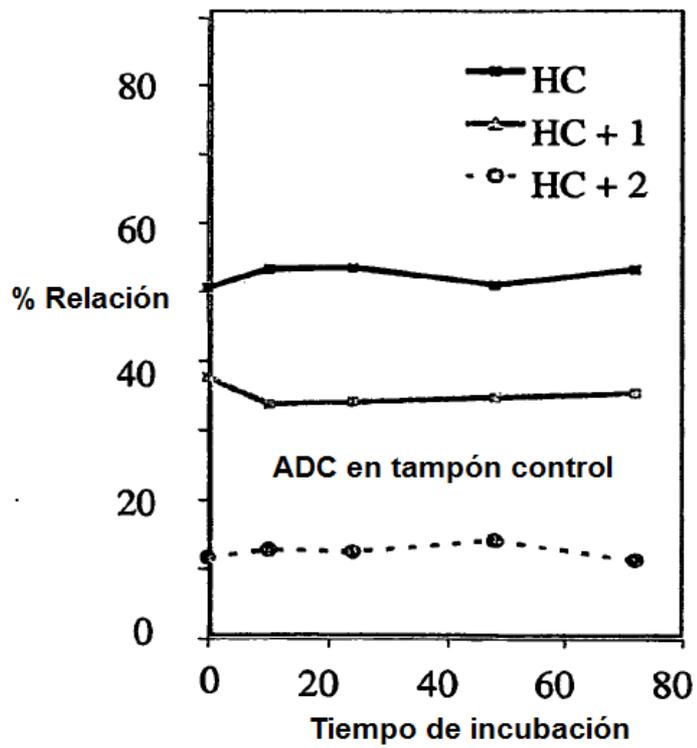


Figura 46

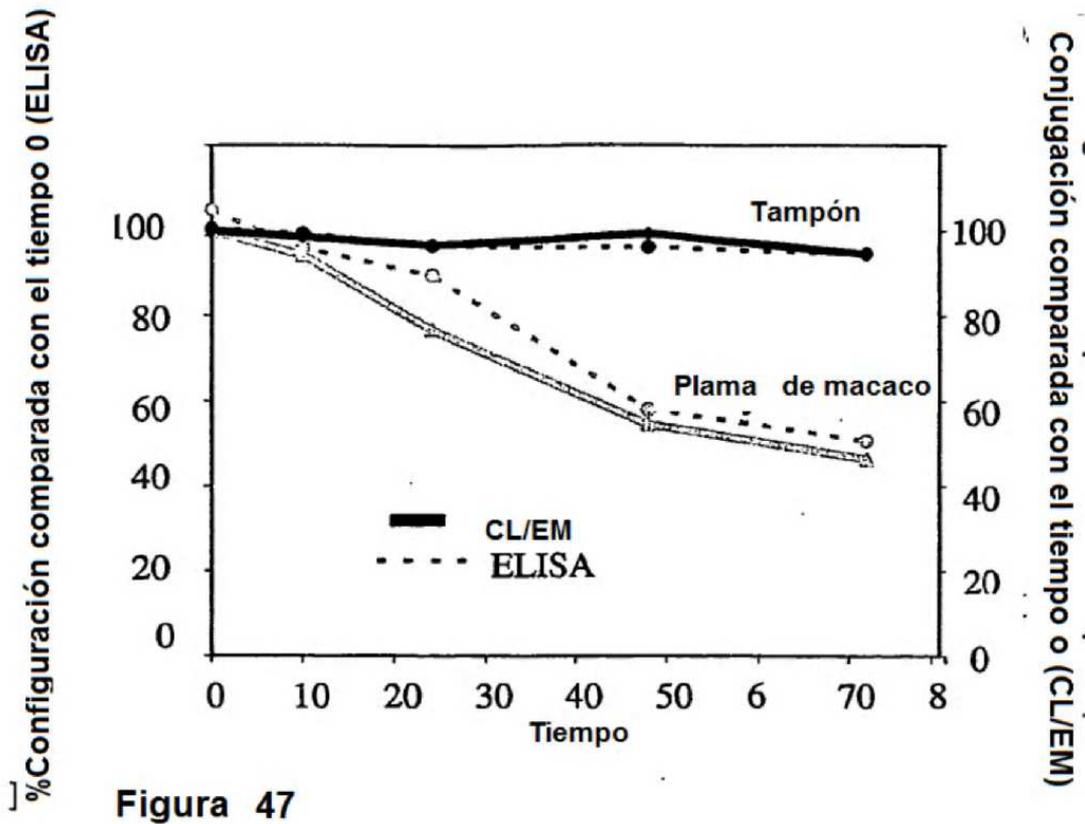


Figura 47

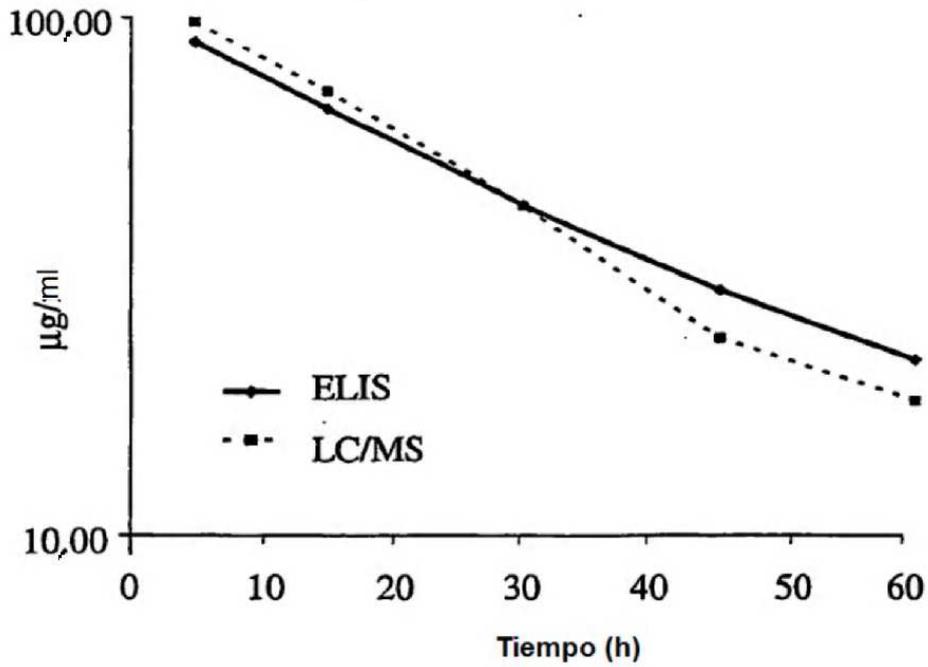


Figura 48