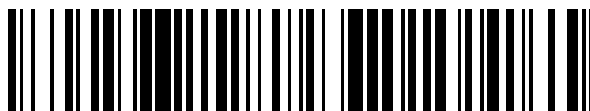


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 699**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2012 PCT/US2012/057649**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13049410**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2012 E 12834802 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2764351**

54 Título: **Determinación de la masa intacta de compuestos de agentes conjugados con proteínas**

30 Prioridad:

29.09.2011 US 201161540839 P
14.09.2012 US 201261701489 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
10.04.2019

73 Titular/es:

SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)
21823 30th Drive, S.E.
Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

VALLIERE-DOUGLASS, JOHN FAY y
SALAS, OSCAR

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 708 699 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

Determinación de la masa intacta de compuestos de agentes conjugados con proteínas

5 Antecedentes de la invención

Los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) son compuestos para el suministro dirigido de su carga útil a una diana. En muchos casos, la diana es un antígeno asociado a un tumor (TAA) y la carga útil es un fármaco.

- 10 Existen varias clases de anticuerpos que incluyen IgG1 e IgG2. La estructura de un anticuerpo IgG1 e IgG2 incluye dos cadenas pesadas (HC) y 2 cadenas ligeras (LC). Las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras se presentan como un complejo que comprende un anticuerpo intacto. Cada anticuerpo IgG1 tiene 12 enlaces disulfuro intracatenarios y 4 intercatenarios creados mediante la oxidación de sus cisteínas respectivas en cada cadena del anticuerpo. Existen dos enlaces disulfuro entre la cadena pesada y la cadena ligera y dos enlaces disulfuro entre la
- 15 cadena pesada y cadena pesada. La reducción completa de los enlaces disulfuro intercatenarios de un anticuerpo IgG1 da como resultado que el complejo de anticuerpo se mantenga mediante interacciones no covalentes.

- La reducción completa de los enlaces disulfuro intracatenarios de un anticuerpo IgG1 da lugar a ocho tioles accesibles para la conjugación con un fármaco, en general mediante un enlazador. Variando los parámetros de
- 20 reducción, se pueden obtener isómeros de anticuerpo con desde 0 a 8 tioles disponibles para la conjugación. Por ejemplo, reduciendo una IgG1 con DTT se pueden obtener anticuerpos con 2, 4, 6, u 8 tioles accesibles. Los ADN completamente reducidos se mantienen juntos por interacciones no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, hidrofobia e interacciones de van der Waals, y se separarán en cadenas ligera y pesada en condiciones de desnaturalización (por ejemplo, en cromatografía de fase inversa). Los ADC no reducidos
- 25 completamente se mantienen juntos por interacciones covalentes y no covalentes. Las partes de ADC no reducidas completamente que se mantienen juntas por medios covalentes también se pueden separar en condiciones desnaturalizantes.

- Los ADC de IgG1 completamente cargados tienen una molécula de fármaco unida a cada cisteína que producen los
- 30 disulfuros intercatenarios de un anticuerpo con un total de ocho fármacos por anticuerpo. Los ADC parcialmente cargados tienen en general 2, 4, o 6 moléculas de fármaco unidas a los restos de cisteína. También se observan ADC cargados parcialmente que tienen 1, 3, y 5 moléculas de fármaco unidas a los restos de cisteína. Aunque la masa de los fragmentos constituyentes de los ADC cargados se ha ensayado por espectrometría de masas (MS), sigue existiendo un problema en el campo con el que se relaciona la presente invención con respecto al ensayo de
- 35 la masa del ADC intacto cargado.

- Aunque las técnicas para la medición directa de la masa de un ADC intacto cargado no están disponibles, se conocen distintos medios indirectos para la medición de la masa de los ADC cargados. Por ejemplo, la masa de un
- 40 ADC se ha medido uniendo una muestra (por ejemplo, un ADC) a una columna cromatográfica líquida de alta presión. De fase inversa calentada (rp-HPLC) en presencia de poco o ningún disolvente orgánico que contiene también normalmente un ácido de emparejamiento iónico (por ejemplo, ácido trifluoroacético) y que permite que se laven las sales no volátiles y los tensioactivos de la muestra (a lo que se hace referencia comúnmente como desalado). En este ejemplo, la proteína se eluye de la columna de rp-HPLC aumentando el contenido orgánico del disolvente hasta el punto en el que las interacciones entre los dominios proteicos hidrófobos y la superficie de la
- 45 columna de rp-HPLC se destruyen mediante un disolvente orgánico no polar. Un efecto no deseable de esta técnica es que se destruye la estructura proteica sometiendo las muestras proteicas al calor, ácido y disolventes orgánicos, cualquiera de los cuales puede desnaturalizar las proteínas y destruir la estructura proteica. Cuando los complejos proteicos no covalentes se someten a una rp-HPLC se separan en sus entidades covalentes que los constituyen. En el caso de un anticuerpo IgG1 con 8 fármacos unidos a las cisteínas intercatenarios, el desalado en una columna de
- 50 rp-HPLC da como resultado la completa disociación del ADC en las cadenas pesadas con 3 fármacos por cadena y las cadenas ligeras con 1 fármaco por cadena. Aunque la masa de los fragmentos constituyentes se puede determinar por técnicas de espectrometría de masas (MS), las técnicas para la determinación de las masas de la entidad intacta no existen en el campo al que pertenece la presente invención.

- Las técnicas de MS actuales carecen de la medición de la masa de ADC intactos debido, en parte, al hecho de que estas técnicas dan lugar a la desnaturalización proteica y/o consumen demasiado tiempo para los usos que se
- 55 contemplan en el presente documento. Virtualmente, todos los métodos de MS con ionización y electropulverización nativa (ESI) de las proteínas especifican que este procedimiento debería llevarse a cabo a escala de nanopulverizador (con un caudal de 100 a 500 nanolitros/minuto) para minimizar la destrucción de la estructura proteica que se produciría por la cubierta calentada y la desolvatación de gases que se utilizan para la ESI convencional. El procedimiento de manejo de la muestra para la medición de la masa nativa de un ADC que utiliza técnicas de MS-ESI con nanopulverizador convencionales consume mucho tiempo y no es adecuado para un alto
- 60 rendimiento. Sin incluir el tiempo para desglicosilar el anticuerpo, se tarda al menos una hora por muestra para obtener una medición de masa.

65

Lazar et al., *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005,19(13):1806-1814 expone una MS-ESI para el análisis de anticuerpos recombinantes e inmunoconjugados, incluyendo la preparación de la muestra y el desalado de la muestra. Wakankar et al., *MABS* 2011, 3(2):161-172 revisa los métodos analíticos utilizados para la caracterización de los ADC, tales como espectrometría de masas proteica y electroforesis de capilaridad.

Además, los métodos conocidos anteriormente para analizar los ADC unidos a los cisteinilos intercatenarios tampoco son adecuados para la espectrometría de masas en línea (por ejemplo, HIC) o dan como resultado la disociación desnaturalizante de las cadenas pesada y ligera conjugadas durante la separación cromatográfica y la posterior medición de masa (por ejemplo, rp-HPLC). Por lo tanto, existe una necesidad en el campo al que pertenece la presente invención de métodos para la determinación de rutina y rápida de la masa intacta de un ADC unido a cisteínas.

Sorprendentemente, la presente invención cumple esta necesidad así como otras necesidades no satisfechas en el campo proporcionando métodos, dispositivos, y sistemas para detectar la masa de un conjugado de agentes proteicos asociados no covalentemente.

Breve resumen de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un método para la detección o determinación de una masa de compuesto conjugado de anticuerpo fármaco. El método incluye las etapas de proporcionar un compuesto de conjugado anticuerpo fármaco en una sal volátil y liebre de una sal no volátil, en el que el compuesto de conjugado anticuerpo fármaco tiene de uno a ocho restos de fármaco conjugados a los disulfuros intercatenarios reducidos, se asocia no covalentemente y no está desnaturalizado, y mantiene su estructura de anticuerpo bivalente intacta; la introducción del compuesto de conjugado anticuerpo fármaco en un espectrómetro de masas; y establecer directamente la masa de la estructura bivalente intacta del compuesto de conjugado anticuerpo fármaco por espectrometría de masas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las estructuras de IgG1 de distintos ADC representativos con una MR de 0 a 8 incluyendo los isómeros producidos por conjugación de un anticuerpo con un agente que es, en un aspecto, un fármaco, en otro aspecto, un marcador, y en otro aspecto más, una toxina. Los enlaces disulfuro entre las subunidades del anticuerpo (denominado mAb en la Figura) (MR = 0) están unidos a fármacos en el ADC que da como resultado en especies unidos a fármacos 2LC-2HC asociados no covalentemente.

La Figura 2 muestra la MS no procesada ni desglosada asociada con la medición de la masa de mAb-A desglicosilado en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes. Los datos de la MS no procesados y no desglosados obtenidos en las condiciones desnaturalizantes se muestran en los paneles A y C, respectivamente, y los datos de la MS no procesados y desglosados obtenidos en condiciones no desnaturalizantes se muestran en los paneles B y D, respectivamente. Los iones evidentes entre 200 y 3500 m/z del panel B que es la región en la que el anticuerpo desnaturalizado sería evidente se deben a la presencia de PNGasa F que se utilizó para la desglicosilación y el detergente no iónico Tween-80.

La Figura 3 muestra la MS no procesada y desglosada asociada a la medición de masa de un maleimidocaproil monometil auristatina F desglicosilada (mcMMAF), conjugado ADC-A en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes. Los datos de MS no procesados y desglosados obtenidos en condiciones desnaturalizantes se muestran en los paneles A y C, respectivamente, y los datos de la MS no procesados y desglosados obtenidos en condiciones no desnaturalizantes se muestran en los paneles B y D, respectivamente. Los múltiples iones cargados para el ADC-A se indican con corchetes en el panel B y los artefactos del desglose presentes en los paneles C y D se indican con asteriscos.

La Figura 4 muestra un espectro de masas desglosado para un maleimidocaproil monometil auristatina F (mcMMAF) desglicosilado conjugado ADC-A y el material parental correspondiente, mAb-A. Las estructuras de ADC asociadas no covalentemente se muestran encima del ion correspondiente en la MS.

La Figura 5 muestra un espectro de masas desglosado para un mc-Val-Cit-PAB monometil auristatina E (vcMMAE) desglicosilada conjugado ADC-B y el material parental correspondiente, mAb-B. Las estructuras ADC asociadas no covalentemente se muestran encima del ion correspondiente en la MS.

La Figura 6 muestra los niveles relativos de las relaciones molares de vcMMAF por IgG1 ADC-A (panel A) y vcMMAE por IgG1 ADC-B (panel B), como se determinó por cuantificación basada en MS para los espectros de masas desglosados y por integración de UV de las especies separadas por BIC.

La Figura 7 muestra una comparación de los cromatogramas de los análisis de SEC de columna dual del ADC desalado y el material de partida correspondiente.

La Figura 8 muestra el porcentaje relativo de vcMMAE por concentración de sales para los conjugados que tiene valore de MR de 0, 2, 4, 6, y 8.

La Figura 9 los resultados de una caracterización de separación de un ADN mcMMAF por HIC (panel A), seguido por un análisis de las fracciones recolectadas por SEC-MS (panel B).

La Figura 10 muestra un análisis de las fracciones individuales de la separación por HIC que muestra que la posición de la unión con el fármaco en las cadenas polipeptídicas de la ADC se puede evaluar por la masa de los fragmentos disociados utilizando SEC-MS.

La Figura 11 muestra una medición de masas por MS desglosada para un conjugado de proteína con un agente que tiene una MR = 0, 2, 4, 6, u 8.

La Figura 12 muestra una medición de masas por MS desglosadas para un conjugado de proteína con un agente que tienen una MR = 0, 2, 4 o 6.

Descripción detallada de la invención

I. General

La presente divulgación expone métodos para detectar la masa de un compuesto de conjugado de proteína con un agente asociado no covalentemente. Estos métodos incluyen las etapas de: (a) proporcionar un compuesto de conjugado de proteína con un agente en una matriz; (b) introducir el compuesto de conjugado de proteína con un agente eluído en un espectrómetro de masas; y (c) establecer directamente la masa del compuesto de conjugado de proteína con un agente por espectrometría de masas. En realizaciones adicionales, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturizantes para el compuesto de conjugado de proteína con un agente de la matriz para efectuar la separación del compuesto de conjugado de agente proteico de la matriz. En algunas de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de proteína con un agente está sustancialmente no desnaturizado. En realizaciones adicionales más, el compuesto de conjugado de proteína con un agente no desnaturizado se eluye del compuesto de medio de separación en una sal volátil.

II. Definiciones

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos científicos o terminología utilizada en el presente documento tienen la intención de tener los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. En algunos casos, los términos con los significados entendidos comúnmente se definen en el presente documento por claridad y/o por facilidad de referencia, y la inclusión de dichas definiciones del presente documento no debería interpretarse necesariamente que represente una diferencia sustancial sobre lo que se entiende en general en la técnica. Muchas de estas técnicas y procedimientos descritos o referenciados en el presente documento se entienden bien y se emplean comúnmente utilizando una metodología convencional por los expertos en la técnica. Según sea apropiado, los procedimientos que implican el uso de kits disponibles en el mercado y los reactivos se llevan a cabo en general de acuerdo con los protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante a menos de que ese señale otra cosa.

Cuando se utilizan en el presente documento nombres comerciales, se pretende que se incluya independientemente la formulación del producto del nombre comercial, el fármaco genético, y los ingredientes farmacéuticos activos del producto de nombre comercial.

Como se utiliza en el presente documento, la abreviatura "MR" se refiere al número de moléculas de fármaco conjugado con, por ejemplo, la proteína o el anticuerpo. Por ejemplo, MR = 0 significa que se han conjugado cero moléculas de fármaco a una proteína determinada o un anticuerpo determinado. MR = 8 significa que hay ocho moléculas de fármaco conjugadas con una proteína determinada o un anticuerpo determinado. MR puede incluir 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

A menos de que se establezca otra cosa, los siguientes términos y frases como se utilizan en el presente documento tienen la intención de tener los siguientes significados:

Como se utiliza en el presente documento, el término "ADC" se refiere a un conjugado de fármaco anticuerpo. La porción de anticuerpo del ADC tiene especificidad por un antígeno. Los antígenos de interés incluyen pero no se limitan a CD30, CD40, CD19, CD33, y CD70.

Como se utiliza en el presente documento, el término "proteína" se refiere a compuestos que comprenden uno o más polipéptidos normalmente plegados en una forma tridimensional, y que pueden facilitar una función biológica.

Como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y su equivalente y no se refiere a una longitud de producto específica; por lo tanto "péptidos" y "proteínas" se incluyen en

la definición de polipéptido. también está incluido en la definición de proteínas “anticuerpos” como se define en el presente documento. Una “región de polipéptido” se refiere a un segmento de un polipéptido, cuyo segmento puede contener, por ejemplo, uno o más dominios o motivos (por ejemplo, una región polipeptídica de un anticuerpo puede contener, por ejemplo, una o más CDR).

5 Como se utiliza en el presente documento, el término “fragmento” se refiere a una porción de un polipéptido que tiene normalmente al menos 20 aminoácidos contiguos o al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido.

10 Como se utiliza en el presente documento, la frase “proteína asociada no covalentemente” se refiere a una proteína en la que al menos una asociación covalente entre las cadenas del polipéptido se ha alterado y que mantiene su estructura terciaria o cuaternaria. Por ejemplo, en referencia a un ADC, una proteína asociada no covalentemente es una proteína que se somete a reducción de sus enlaces disulfuro intercatenarios mientras que mantiene su estructura intacta (es decir, las dos cadenas pesadas se mantienen asociadas con las dos cadenas ligeras). Los ADC están compuestos de interacciones covalentes y no covalentes. Las interacciones covalentes se mantienen en algunos ADC, por ejemplo, los ADC que tienen 2, 4, o 6 cargas farmacológicas. En un ejemplo de un ADC que tiene 15 2 cargas farmacológicas, el ADC tiene disulfuros intercatenarios covalentes entre ambas cadenas pesadas y una entre la cadena ligera y la cadena pesada con el otro de cadena ligera con la cadena pesada como una estructura no covalente. De la misma manera, en un ejemplo de un ADC cargado con 4 fármacos, también está compuesto de interacciones covalentes y no covalentes entre las cadenas pesada y ligera.

20 Como se utiliza en el presente documento, la frase “compuesto de conjugado de proteína con un agente” se refiere a un compuesto que incluye una proteína conjugada con un agente. La proteína puede ser, pero no se limita a, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión con Fc, o un complejo proteico no covalente. En algunos aspectos la proteína puede ser un anticuerpo. En otro aspecto, la proteína es un fragmento de anticuerpo. 25 En otros aspectos la proteína puede ser una proteína de fusión con Fc. En otros aspectos adicionales, la proteína puede estar compuesta de un complejo de subunidades no unidas por enlaces covalentes. Ejemplos de estos tipos de proteínas son hemoglobina, que es un conjunto tetramérico de 2 cadenas alfa y 2 cadenas beta asociadas no covalentemente, Concanavalina A que es un tetramero, y el receptor estrogénico que es un dímero. Las proteínas de fusión con Fc implican el injerto de una proteína funcional o un dominio proteico en un Fc dimérico de manera 30 que los monómeros de Fc se unen por restos de cisteína en la región bisagra del Fc. La proteína puede tener una estructura cuaternaria que no se mantenga unida por enlaces covalentes sino solo por interacciones no covalentes. Un ejemplo es la hemoglobina que está compuesta por 4 subunidades que se pueden disociar en condiciones desnaturizantes. Las cisteínas de la hemoglobina se pueden conjugar con fármacos, pero, al contrario que los anticuerpos, las cisteínas no participan actualmente en la unión covalente de la estructura de subunidades.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término “agente” se refiere a un fármaco, un marcador, toxina o similares.

40 Como se utiliza en el presente documento, el término “matriz” se refiere al contexto o medio en el que la proteína o compuesto de conjugado de un agente con una proteína está presente. Por ejemplo, una “matriz” incluye tampones de formulación, suero biológico, tensioactivos, excipientes, o medios de cultivo celular.

45 Como se utiliza en el presente documento, la frase “condición no desnaturizante” se refiere a una condición en la que las proteínas (por ejemplo, anticuerpos) no pierden sus estructuras secundaria, terciaria o cuaternaria. Las condiciones no desnaturizantes incluyen la ausencia de calor en exceso del nivel que causaría un despliegue térmico (por ejemplo, 50 °C o más) y extremos de pH (por ejemplo, por debajo de un pH 5 y por encima de un pH 8).

50 Como se utiliza en el presente documento, la frase “proteína no desnaturizada” significa una proteína (por ejemplo un anticuerpo) que ha mantenido su estructura secundaria, terciaria, y, cuando sea aplicable, cuaternaria.

55 Como se utiliza en el presente documento, la frase “proteína reducida” (por ejemplo, un anticuerpo) se refiere a una proteína en la que sus enlaces disulfuro intercatenarios se han roto.

60 Como se utiliza en el presente documento, la frase “proteína desnaturizada” (por ejemplo un anticuerpo) es en la cual la proteína ha perdido su estructura secundaria, terciaria o cuaternaria.

65 Como se utiliza en el presente documento, el término “sustancialmente” significa un se refiere a la fase líquida móvil que se 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o 10 % de la cantidad medida por los niveles relativos de las relaciones molares como se determina en la cuantificación basada en MS a partir del espectro de masas desglosado y por la integración por UV de las especies separadas por HIC, cuyas proteínas (por ejemplo, anticuerpos) no están desnaturizadas siguiendo la etapa de separación en el medio (por ejemplo, por SEC).

Como se utiliza en el presente documento, el término “eluyente” se refiere a la fase líquida móvil que disocia los analitos a partir de una fase estacionaria en columna de cromatografía. Los analitos incluyen, pero no se limitan a, 65 compuestos de interés que se van a medir.

Como se utiliza en el presente documento, el término “directamente” se refiere al contexto para el establecimiento de la masa de una proteína (incluyendo un compuesto de conjugado de un agente con una proteína) que incluye la medición de la masa del conjunto cuaternario completo, por ejemplo, la entidad intacta, tal como un complejo con anticuerpo.

Como se utiliza en el presente documento, el término “indirectamente” significa la medición de la masa de la proteína (incluyendo un compuesto de conjugado de proteína con un agente) midiendo las masas de las subunidades que comprenden el conjunto cuaternario, por ejemplo, las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo, y sumando en conjunto las masas para llegar a un número para la entidad intacta.

“Desalado” se refiere a la separación de una muestra proteica (incluyendo un compuesto de conjugado de proteína con un agente) de las sales no volátiles, excipientes y/o tensioactivos.

Una “sal volátil” se refiere a una sal que entra en fase gaseosa a la presión del entorno ambiental (1 atmósfera). Las sales volátiles incluyen, por ejemplo, formato amónico, acetato amónico, carbonato amónico.

Un “tensioactivo” incluye, pero no se limita a, compuestos no volátiles de la matriz. Por ejemplo, los tensioactivos incluyen detergentes no iónicos o zwitterónicos, tales como polisorbato 20 (“Tween 20”) y polisorbato 80 (“Tween 80”).

Un “agente caotrópico” se refiere a un producto químico que desestabiliza los enlaces hidrógeno, fuerzas de van der Waals y las interacciones hidrófobas entre las proteínas y entre subdominios de una proteína y posteriormente da como resultado la desnaturalización. Los compuestos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, guanidina-HCl, urea, y otros compuestos conocidos por el experto en la técnica.

Un “excipiente” incluye compuestos tales como azúcares y polioles, por ejemplo, sacarosa, trealosa y sorbitol.

“Espectrometría de masas” (MS) es una técnica analítica que se utiliza para medir la relación de masa respecto a la carga de partículas cargadas. Se puede utilizar para deducir la estructura primaria de las proteínas.

“Cromatografía líquida” o “LC” se refiere a un método de separación de mezclas. La mezcla se disuelve en un fluido llamado fase móvil que la transporta a través de una estructura llamada fase estacionaria. En el caso de la cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) los distintos constituyentes de la mezcla viajan a diferentes velocidades, haciendo que se separen. La separación se basa en la partición diferencial entre las fases estacionaria y móvil.

“Cromatografía de exclusión por tamaño” (SEC) se refiere a un método de cromatografía en el que las moléculas se separan por su tamaño y no por otro parámetro de separación tal como el peso molecular o la polaridad. Se aplica a grandes moléculas tales como proteínas. En la cromatografía de exclusión por tamaño, las sales se utilizan primariamente como fase móvil. En algunos casos, también pueden estar presentes en la fase móvil agentes orgánicos y caotrópicos. La fase estacionaria habitualmente es, pero no se limita a, una de las siguientes, poliestireno reticulado, derivado de sílice, acrílico, acrílico hidroxilado, acrílico, de agarosa, o una estructura de polihidroxietil-aspartamida. El armazón de resina se puede derivar con cualquiera número de especies y la elección del agente de derivación está dirigida normalmente por una necesidad de reducir interacciones moleculares no deseadas entre el analito que se va a separar y la columna que se emplearía en un método de separación basado en un parámetro de separación distinto del tamaño del compuesto.

Como se utiliza en el presente documento la frase “tampón de SEC volátil compatible con espectrometría de masas” se refiere a la fase móvil de una SEC que es compatible para su uso en una MS.

Como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere en su sentido más amplio a un anticuerpo, como se utiliza en el campo relevante al que pertenece la presente invención, y específicamente cubre anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpo biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivados de otras especies.

Como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” también se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno inmuno-específicamente de una diana de interés o una parte de la misma, dichas dianas incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas, o células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina desvelada en el presente documento puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases de la molécula de inmunoglobulina.

- Como se utilizan en el presente documento, los términos “fragmentos de anticuerpo” incluyen, pero no se limitan a, una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable de la misma. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; Fc, Fc medios (1/2 Fc), diacuerpos; anticuerpo lineales, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de complementariedad), ECD (dominio extracelular), y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores que se una inmunoespecíficamente a antígenos celulares del cáncer, antígenos víricos, o antígenos microbianos; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.
- 10 Como se utiliza en el presente documento, un “anticuerpo intacto” se refiere a un anticuerpo que incluye los dominios VH y VL, así como los dominios constantes completos de cadena pesada y ligera y se mantienen asociadas mediante al menos una interacción no covalente. Un “fragmento de anticuerpo intacto” incluye una parte de un anticuerpo de longitud completa que se mantiene asociada mediante al menos una interacción no covalente.
- 15 La expresión “enlace disulfuro intercatenario”, en el contexto de un anticuerpo, se refiere a un enlace disulfuro entre dos cadenas pesadas, o una cadena pesada y una ligera.
- La expresión “enlace disulfuro intracatenario”, en el contexto del anticuerpo, se refiere a un enlace disulfuro formado a partir de 2 restos de cisteína en la misma cadena polipeptídica.
- 20 La expresión “tiol intercatenario” se refiere a un grupo tiol, de una cadena pesada y ligera de anticuerpo que puede participar en la formación de un enlace disulfuro intercatenario.
- La expresión “anticuerpo monoclonal” o “mAb” como se utiliza en el presente documento 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 de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, al contrario que con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.
- 25 Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga con secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena(s) es(son) idénticas u homólogas a secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a fragmentos de dichos anticuerpos.
- 35 El anticuerpo intacto puede tener una o más “funciones efectoras” que se refieren a las actividades que se pueden atribuir a la región Fc (una secuencia nativa de la región Fc o una secuencia de aminoácidos de una región variante de Fc) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; y regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B; BCR).
- 40 El anticuerpo puede ser una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente activo del mismo. Por ejemplo, en anticuerpo se puede fusionar mediante un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), en el extremo N o el extremo C respecto a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o parte de la misma, tal como al menos una parte 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.
- 45 La expresión “proteína de fusión” como se utiliza en el presente documento puede referirse también en el contexto de fusiones de dominio de unión-Ig en el que el dominio de unión puede ser, por ejemplo, un ligando, un dominio extracelular de un receptor, un péptido, un péptido no de origen natural o similar, a condición de que el dominio de unión no incluya un dominio variable de un anticuerpo. Como las proteínas y anticuerpos descritos en el presente documento, la parte de Ig de la proteína de fusión debe comprender al menos un enlace disulfuro reducible. En un aspecto, el dominio Ig será la región Fc de un anticuerpo. Ejemplos de proteínas de fusión dominio-Ig incluye el etanercept que es una proteína de anticuerpo de sNTRFII con la región Fc (Pat. de EE. UU. N.º 5.605.690), alefarcept que es una proteína de fusión de LFA-3 expresado en las células presentadoras de antígeno con la región Fc (Pat de EE. UU. N.º 5.914.111), una proteína de fusión del antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) con la región Fc (J. Exp. Med. 181:1869 (1995)), una proteína de fusión de interleucina 15 con la región Fc (J. Immunol. 160:5742 (1998)), una proteína de fusión del factor VII con la región Fc (Proc. Natl. Acad. Sci. LISA 98:12180 (2001)), una proteína de fusión de interleucina 10 con la región Fc (J. Immunol. 154:5590 (1995)), una proteína de fusión de interleucina 2 con la región Fc (J. Immunol. 146:915 (1991)), una proteína de fusión de CD40 con la región Fc (Surgery 132:149 (2002)), una proteína de fusión de Flt-3 (tirosina cinasa tipo fms) con la región Fc del anticuerpo (Acta. Haeraato. 95:218 (1996)), una proteína de fusión de OX40 con, la región Fc del anticuerpo (J. Leu. Biol. 72:522 (2002)), y proteínas de fusión con otras moléculas de CD (por ejemplo, CD2, CD30 (TNFRSF8),
- 50
- 55
- 60
- 65

CD95 (Fas), CD106 (VCAM-1), CD137), moléculas de adhesión (por ejemplo, ALCAM (molécula de adhesión celular de leucocito activado), cadherinas, ICAM(molécula de adhesión intercelular)-1, ICAM-2, ICAM-3), receptores de citocinas (por ejemplo, interleucina-4R, interleucina-5R, interleucina-6R, interleucina-9R, interleucina-10R, interleucina-12R, interleucina-13R alfa 1, interleucina-13R alfa 2, interleucina-15R, interleucina-21Ralfa), quimiocinas, moléculas de señal que inducen la muerte celular (por ejemplo, B7-H1, DR6 (receptor mortal 6), PD-1 (muerte programada-1), TRAILR1), moléculas co-estimulantes (por ejemplo, B7-1, B7-2, B7-H2, ICOS (co-estimulante inducible)), factores de crecimiento (por ejemplo, ErbB2, ErbB3, ErbB4, HGFR), factores inductores de diferenciación (por ejemplo, B7-H3), factores activadores (por ejemplo, NKG2D), moléculas de transferencia de señal (por ejemplo, gpBO), BCMA, y TACI.

La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil auristatina E.

La abreviatura "MMAF" se refiere a dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaprolina-fenilalanina, a la que también se hace referencia como monometil auristatina F.

El término "marcador" significa un resto que puede unirse covalentemente a una anticuerpo y que funciona para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primer o segundo marcador, por ejemplo FRET (transferencia de energía en resonancia de fluorescencia); (iii) estabilizar las interacciones o aumentar la afinidad de unión con el antígeno o el ligando; (iv) afectar la movilidad, por ejemplo, la movilidad electroforética, o la permeabilidad celular, por carga, hidrofobia, 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 se pueden conjugar con cualquier resto marcador que pueda unirse covalentemente al anticuerpo mediante el tiol de la cisteína. Para las aplicaciones diagnósticas, el anticuerpo normalmente se marcará con un resto detectable.

El "fármaco" o "resto farmacológico" puede ser cualquier fármaco citotóxico, citostático o inmunomodulador (por ejemplo, inmunosupresor). En muchos casos, los fármacos se conjugan al anticuerpo mediante un enlazador. Por ejemplo, se describen enlazadores en las Patentes de EE. UU. N.º 7.754.681; 7.375.078; 7.829.531; 7.659.241; 7.851.437; 7.829.531; 7.659.241; 7.498.298; 7.994.135; 7.964.567 y 7.964.567; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad y para todos los fines. En un aspecto, el enlazador es valina-Citrulina ("Val-Cit" o "vc"). En otro aspecto, el enlazador es maleimidocaprol ("mc").

II. Métodos

Se hará referencia ahora en detalle a ciertas realizaciones.

Un experto en la técnica reconocerá que se podrían utilizar muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en la práctica de la presente divulgación. La presente divulgación no se limita a los métodos y materiales descritos.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para la detección de una masa de un compuesto de complejo de proteína con un agente. En ciertas realizaciones los métodos incluyen las siguientes etapas: (a) proporcionar un compuesto de conjugado de una proteína con un agente no desnaturalizado y asociado no covalentemente en una sal volátil y libre de una sal no volátil; (b) introducir el compuesto de conjugado de una proteína con un agente en un espectrómetro de masas; y (c) establecer directamente la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente mediante espectrometría de masas.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para la detección de una masa de un compuesto de conjugado de una proteína con un agente asociado no covalentemente. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen las siguientes etapas: (a) proporcionar un compuesto de conjugado de una proteína con un agente en una sal volátil y libre de una sal no volátil; (b) introducir el compuesto de conjugado de una proteína con un agente en un espectrómetro de masas; y (c) establecer directamente la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente por espectrometría de masas.

En algunos de los métodos descritos en el presente documento, los métodos incluyen adicionalmente la aplicación de un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de una proteína con un agente para efectuar la separación del compuesto de conjugado de una proteína con un agente de una matriz, por el que el compuesto de conjugado de una proteína con un agente está sustancialmente no desnaturalizado. En otras realizaciones los métodos incluyen la etapa de introducir un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto del conjugado de una proteína y un agente para efectuar la separación del compuesto de conjugado de una proteína con un agente de una matriz, de manera que el compuesto de conjugado de una proteína con un agente está sustancialmente no desnaturalizado.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el método incluye la elución del medio de separación de un compuesto de conjugado de una proteína con un agente. En ciertas realizaciones, las condiciones no desnaturalizantes incluyen un tampón de SEC volátil compatible con espectrometrías de masas. En algunas realizaciones adicionales, la sal volátil incluye formato amónico, acetato amónico. En ciertas otras realizaciones, la sal volátil es acetato amónico. En otras realizaciones, la sal volátil es carbonato amónico. En ciertas otras realizaciones, la sal volátil es una mezcla de las sales volátiles que se exponen en el presente documento.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos, descritos en el presente documento, en el que la matriz incluye una sal volátil, un tensioactivo, o un tampón.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, la presente divulgación proporciona métodos que incluyen la cuantificación de la distribución relativa de compuestos de conjugados de una proteína con un agente por intensidad iónica desglosada. En algunas de estas realizaciones, los métodos incluyen la cuantificación de la distribución relativa de los compuestos de conjugado de proteína con un agente. En algunas de estas realizaciones, los métodos incluyen el desglose de la intensidad de un ensayo descrito en el presente documento con el fin de cuantificar la distribución relativa de los compuestos de conjugado de una proteína con un agente.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente incluye un conjugado de un anticuerpo con un fármaco.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, la matriz incluye una formulación. En ciertas realizaciones, la matriz es una formulación.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, el medio de separación incluye una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). En ciertas realizaciones, el medio de separación es la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)A. En ciertas realizaciones descritas en el presente documento, los métodos incluyen la etapa de separación de conjugados de una proteína con un agente, que se exponen en el presente documento, mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, el agente incluye un fármaco, una toxina, o un marcador. En algunas realizaciones, el agente es un fármaco. En algunas otras realizaciones, el agente es una toxina. En algunas otras realizaciones, el agente es un marcador. En ciertas realizaciones, el agente es una combinación de cualquiera de los agentes expuestos en el presente documento.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, la SEC incluye una columna de sílice, poliestireno-divinilbenceno o polihidroxietil-aspartamida. En algunas realizaciones, la SEC incluye una columna de sílice. En algunas otras realizaciones, la SEC incluye una columna de poliestireno-divinilbenceno. En algunas otras realizaciones, la SEC incluye una columna de polihidroxietil-aspartamida.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, las condiciones no desnaturalizantes incluyen una temperatura de 50 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura de las condiciones no desnaturalizantes no es mayor de 50 °C. En algunas realizaciones, la temperatura de las condiciones no desnaturalizantes es una temperatura ambiente. La temperatura ambiente incluye, pero no se limita a, temperaturas de 20-24 °C.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, la espectrometría de masas se lleva a cabo en una ESI-MS. En otras realizaciones, la espectrometría de masas se lleva a cabo en un espectrómetro de masa unido a otro dispositivo tal como un cromatógrafo o boquilla de pulverizador para el suministro de la muestra que se va a analizar en la MS.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, la concentración de la sal volátil es de 50 a 400 mM. En algunas realizaciones, la concentración de la sal volátil de 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de sales es de 400 mM. En algunas realizaciones, la concentración de la sal volátil es de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, o 400 mM. En algunas realizaciones, la concentración de la sal volátil es aproximadamente 50 a aproximadamente 400 mM. En este contexto, aproximadamente se refiere a un valor que está entre un 10 % del valor modificado por la palabra aproximadamente. Por ejemplo, aproximadamente 50 mM, incluye 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, y 55 mM. Por ejemplo, aproximadamente 400 mM incluye 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, y 440 mM. En algunas realizaciones, la concentración de la sal volátil es aproximadamente 50 a aproximadamente 300 mM. En algunas realizaciones, la concentración de sal volátil es aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM. En algunas realizaciones, la concentración de la sal volátil es aproximadamente de 50 a aproximadamente 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración de la sal volátil es aproximadamente de 100 a aproximadamente 400 mM. En alguna realización, la concentración de la sal volátil es aproximadamente de 200 a aproximadamente 400 mM. En algunas

realizaciones la concentración de sal volátil es aproximadamente 300 a aproximadamente 400 mM. En algunas realizaciones la concentración de sal volátil es aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración de la sal volátil es de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mM. En algunas realizaciones, la concentración de la sal volátil es aproximadamente 50 a aproximadamente 300 mM. En algunas realizaciones, la concentración de la sal volátil es de aproximadamente 50 a aproximadamente 350 mM.

En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente se introduce inmediatamente en el espectrómetro de masas.

En algunas realizaciones de los métodos que se exponen en el presente documento, el compuesto eluido de conjugado de una proteína con un agente se introduce continuamente en el espectrómetro de masas. En ciertas realizaciones, el medio de separación es una columna de HIC que se ejecuta en condiciones no desnaturizantes. En otras realizaciones, la SEC es una columna de polihidroxietil-A.

En algunas realizaciones de los métodos que se exponen en el presente documento, el tamaño de la columna de SEC es de 0,1 a 7,8 mm de diámetro interno y de 100 a 300 mm de longitud.

En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, los métodos incluyen la etapa de tratamiento del compuesto de conjugado con una proteína con un agente con un reactivo desglicosilante.

En ciertas realizaciones, el reactivo desglicosilante es PNGasa F. En otras realizaciones, el agente desglicosilante incluye un tratamiento enzimático con una exoglicosidasa, un tratamiento con una endoglicosidasa o un tratamiento enzimático que haga una escisión entre el 1º y 2º restos de N-acetilglucosamina en los N-glicanos.

En algunas de las realizaciones descritas en el presente documento, el tratamiento con exoglicosidasa incluye la sialidasa o beta-galactosidasa.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, el tratamiento enzimático que escinde entre el 1º y el 2º resto de N-acetilglucosamina de los N-glicanos incluye Endo-F1, F2 o F3.

En algunas realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, el pH de la sal volátil es de 5,5 a 7,0. En otras realizaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen la etapa en la que el pH de la sal volátil es 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, o 7,0. En algunas realizaciones de los métodos expuestos en el presente documento, el pH de la sal volátil es 6,0. En algunas realizaciones de los métodos expuestos en el presente documento, el pH de la sal volátil es 6,5. En algunas realizaciones de los métodos expuestos en el presente documento, el pH de la sal volátil es 7,0.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, los métodos incluyen la cuantificación del compuesto no desnaturizado de conjugado de una proteína y un agente mediante espectrometría de masas.

En algunas realizaciones de los métodos expuestos en el presente documento, el compuesto no desnaturizado de conjugado de una proteína y un agente incluye un fragmento de cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo. En alguna de estas realizaciones, el fragmento de cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo incluye adicionalmente uno o más fármacos.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, el anticuerpo del conjugado de anticuerpo y fármaco es un fragmento de anticuerpo.

En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, el fragmento de anticuerpo se selecciona de entre un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpo, anticuerpo lineal, o molécula de anticuerpo de cadena sencilla. En algunas de las realizaciones descritas en el presentes documento, el anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD30, anti-CD40, Anti-CD19, anti-CD33 o Anti-CD70. En otras realizaciones, el anticuerpo del conjugado de un anticuerpo con un fármaco es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones el anticuerpo del conjugado de un anticuerpo con un fármaco incluye un anticuerpo humanizado.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, el fármaco es un maitansinoide. En algunas otras realizaciones, el fármaco es una auristatina. En ciertas realizaciones, el fármaco es MMAE. En algunas realizaciones, el fármaco es MMAF.

En realizaciones adicionales de los métodos expuestos en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína y un agente se mide en 7,5 Da. En otras realizaciones la masa del compuesto de conjugado de una proteína y un agente se mide en 25 Da. En ciertas realizaciones, la masa del compuesto de conjugado de una proteína y un agente se mide en 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11,0, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4, 11,5, 11,6, 11,7, 11,8, 11,9, 12,0, 12,1, 12,2, 12,3, 12,4, 12,5, 12,6, 12,7, 12,8,

12,9, 13,0, 13,1, 13,2, 13,3, 13,4, 13,5, 13,6, 13,7, 13,8, 13,9, 14,0, 14,1, 14,2, 14,3, 14,4, 14,5, 14,6, 14,7, 14,8, 14,9, 15,0, 15,1, 15,2, 15,3, 15,4, 15,5, 15,6, 15,7, 15,8, 15,9, 16,0, 16,1, 16,2, 16,3, 16,4, 16,5, 16,6, 16,7, 16,8, 16,9, 17,0, 17,1, 17,2, 17,3, 17,4, 17,5, 17,6, 17,7, 17,8, 17,9, 18,0, 18,1, 18,2, 18,3, 18,4, 18,5, 18,6, 18,7, 18,8, 18,9, 19,0, 19,1, 19,2, 19,3, 19,4, 19,5, 19,6, 19,7, 19,8, 19,9, 20,0, 20,1, 20,2, 20,3, 20,4, 20,5, 20,6, 20,7, 20,8, 20,9, 21,0, 21,1, 21,2, 21,3, 21,4, 21,5, 21,6, 21,7, 21,8, 21,9, 22,0, 22,1, 22,2, 22,3, 22,4, 22,5, 22,6, 22,7, 22,8, 22,9, 23,0, 23,1, 2, 23,3, 23,4, 23,5, 23,6, 23,7, 23,8, 23,9, 24,0, 24,1, 24,2, 24,3, 24,4, 24,5, 24,6, 24,7, 24,8, 24,9, 25,0, 25,1, 25,2, 25,3, 25,4, 25,5, 25,6, 25,7, 25,8, o 25,9 Da.

En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 8,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 9,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 10,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 11,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 12,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 13,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 14,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 15,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 16,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 17,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 18,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 19,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 20,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 21,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 22,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 23,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 24,0 Da. En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 25,0 Da.

En realizaciones adicionales de los métodos que se exponen en el presente documento, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 100 ppm del valor teórico. En otras realizaciones, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente se mide en 80, 90, 100, 110, 120, o 130 ppm del valor teórico.

La presente divulgación expone métodos para el ensayo de masa nativa intacta de conjugados de una proteína con un agente. La presente divulgación también expone métodos para la determinación de la masa nativa intacta de conjugados de una proteína con un agente.

La presente divulgación expone un método para la detección de la masa de un compuesto de conjugado de una proteína con un agente asociados no covalentemente proporcionando un compuesto de conjugado de una proteína con un agente no desnaturalizado en una sal volátil y libre de sales no volátiles; introduciendo el compuesto de conjugado de una proteína con un agente en un espectrómetro de masas; y estableciendo directamente la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente por espectrometría de masas.

La presente divulgación proporciona métodos en los que el conjugado de una proteína con un agente se introduce en un espectrómetro de masas. En más de estas realizaciones, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente intacto se mide directamente. En una de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado y en formato amónico. En algunas de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado y en acetato amónico. En otras de estas realizaciones el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado y en carbonato amónico. En algunas de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente que es no desnaturalizado y en carbonato amónico. En alguna de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente que no está desnaturalizado y en carbonato amónico. En algunas de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente que es no desnaturalizado y en formato amónico. En algunas de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de anticuerpo con un

agente que es no desnaturalizado y en acetato amónico.

La presente divulgación proporciona métodos en los que un conjugado de una proteína con una agente se introduce en un espectrómetro de masas. En más de estas realizaciones, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente intacto se mide directamente. En algunas de otras realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína y un agente es un compuesto de conjugado de un fragmento de anticuerpo con un agente, que no está desnaturalizado y en carbonato amónico. En alguna de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un fragmento de anticuerpo con un agente que no está desnaturalizado y en formato amónico. En algunas de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un fragmento de anticuerpo con un agente que no está desnaturalizado y en acetato amónico.

La presente divulgación proporciona métodos en los que el conjugado de una proteína con un agente se introduce en un espectrómetro de masas. En más de estas realizaciones, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente intacto se mide directamente. En algunas de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado. En algunas de estas realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en formato amónico y el agente es un fármaco. En algunas de estas realizaciones, el conjugado de una proteína y un agente está en formato amónico y el agente es un fármaco. En algunas realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en carbonato amónico y el agente es un fármaco. En cualquiera de estas realizaciones, el fármaco incluye MMAE o MMAF.

En realizaciones relacionadas, los métodos descritos en el presente documento proporcionan que el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente que es no desnaturalizado. En algunas de estas realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en carbonato amónico y el agente es un fármaco. En algunas de estas realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en formato amónico y el agente es un fármaco. En algunas de estas realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en acetato amónico y el agente es un fármaco. En algunas realizaciones, el fármaco incluye, pero no se limita a MMAE o MMAF. En cualquiera de estas realizaciones, el fármaco incluye MMAE. En alguna de estas realizaciones, el fármaco es MMAF.

La presente divulgación proporciona métodos en los que el conjugado de una proteína con un agente se introduce en un espectrómetro de masas. En más de estas realizaciones, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente intacto se mide directamente. En algunas de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado. En algunas realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en formato amónico y el agente es una toxina. En algunas otras realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en carbonato amónico y el agente es una toxina. En algunas realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en acetato amónico y el agente es una toxina. En alguna de estas realizaciones, el agente es una toxina. En cualquiera de estas realizaciones, el agente es un fármaco.

La presente divulgación proporciona métodos en los que el conjugado de proteína con un agente se introduce en un espectrómetro de masas. En más de estas realizaciones, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente intacto se mide directamente. En alguna de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente que no está desnaturalizado. En algunas realizaciones, la concentración de sal es entre 50 y 400 mM. En algunas de estas realizaciones, el agente es un fármaco. En algunas de estas realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en carbonato amónico, acetato amónico, o formato amónico.

En cualquiera de las realizaciones expuestas en el presente documento, los métodos pueden incluir la etapa en la que el compuesto de conjugado se introduce en un espectrómetro de masas, y la masa del conjugado del anticuerpo con un agente intacto se mide directamente.

La presente divulgación proporciona métodos en el que el conjugado de una proteína con un agente se introduce en un espectrómetro de masas. En más de estas realizaciones, la masa del compuesto de conjugado de una proteína y un agente intacto se mide directamente. En algunas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de una proteína con un agente que no está desnaturalizado. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico, carbonato amónico, o en formato amónico. En algunas realizaciones, la concentración de sales está entre 50 y 400 mM. En algunas realizaciones, la concentración de sal es de 200 mM. En otras realizaciones relacionadas, el agente es un fármaco. En otras realizaciones, el pH del tampón está entre 5,0 y 7,0. En cualquiera de estas realizaciones el agente puede ser un fármaco.

En otro aspecto de los métodos descritos en el presente documento, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente que no está desnaturalizado y en formato amónico; la concentración de sal es de 200 mM; el agente es un fármaco; y el pH del tampón está entre 5,0 y 7,0. En algunas de estas realizaciones, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, acetato amónico, o en formato amónico.

En otro aspecto, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente que no está desnaturalizado y en acetato amónico. En algunas realizaciones, la concentración de sal es de 200 mM; el pH del tampón está entre 5,0 y 7,0; y el agente es un fármaco.

En otro aspecto de los métodos del presente documento, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente que no está desnaturalizado, la concentración de sales es de 200 mM; el agente es un fármaco; y el pH del tampón es 6,5. En algunas de estas realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en carbonato amónico, acetato amónico, o en formato amónico. En algunas de estas realizaciones, el agente incluye un fármaco, en el que el fármaco es un fármaco descrito en el presente documento.

En un aspecto de la presente divulgación el compuesto de conjugado de una proteína con un agente está no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de una proteína con un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de conjugado de una proteína con un agente de la matriz. En algunas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, el conjugado se introdujo en un espectrómetro de masas, y la masa de compuesto de conjugado de una proteína con un agente intacto se mide directamente. En algunas de estas realizaciones, el conjugado de una proteína con un agente está en carbonato amónico, acetato amónico, o formato amónico.

La presente divulgación proporciona método en los que un conjugado de una proteína con un agente se introduce en un espectrómetro de masas. En más de estas realizaciones, la masa del compuesto de conjugado de una proteína con un agente intacto se mide directamente. En otro aspecto de los métodos expuestos en el presente documento, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente está no desnaturalizado, y se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de una proteína con un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de conjugado de una proteína con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de una proteína con un agente está sustancialmente no desnaturalizado. En algunas de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente está en carbonato amónico. En algunas de estas realizaciones, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente está en acetato amónico. En realizaciones relacionadas, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el conjugado de proteína en una matriz para efectuar la separación del compuesto de conjugado de una proteína con un agente de la matriz. En realizaciones relacionadas, el medio de separación es SEC.

En cualquiera de los métodos anteriores, los métodos puede incluir que el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de una proteína con un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de conjugado de una proteína con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de una proteína con un agente está sustancialmente no desnaturalizada, y el medio de separación es HIC en condiciones no desnaturalizante. En realizaciones relacionadas, el conjugado de una proteína con un agente está en carbonato amónico. En realizaciones relacionadas, el conjugado de una proteína con un agente está en acetato amónico. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico.

En cualquiera de los métodos anteriores, los métodos pueden incluir que el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de una proteína con un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de conjugado de una proteína con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de una proteína con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es HIC en condiciones no desnaturalizantes. En realizaciones relacionadas, el conjugado de una proteína con un agente está en carbonato amónico, formato amónico, o en acetato amónico. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento el medio de separación puede incluir la SEC.

En otro aspecto de los métodos anteriores, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

En un aspecto de los métodos en los que el conjugado de una proteína con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, y la masa del compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente intacto se mide directamente, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de

conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es HIC en condiciones no desnaturalizantes. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

5 En un aspecto de los métodos en los que el conjugado de proteína se introduce en un espectrómetro de masas, y la masa del compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente intacto se mide directamente, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es HIC en condiciones no desnaturalizantes. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico. En realizaciones relacionadas, el medio de separación es SEC y el espectrómetro de masas es un ESI-MS.

15 En un aspecto de los métodos anteriores, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC, el conjugado se introduce en un espectrómetro de masas, el espectrómetro de masas es un ESI-MS, y la masa del compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente intacto se mide directamente. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

25 En otro aspecto de los métodos anteriores, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

35 En un aspecto de los métodos anteriores, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, el conjugado es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es HIC en condiciones no desnaturalizantes, el conjugado se introduce en un espectrómetro de masas y el espectrómetro de masas es un ESI-MS. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

45 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden incluir la etapa en la que la masa del compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente intacto se mide directamente. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el conjugado de proteína con un agente puede estar presente en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

50 En otro aspecto de los métodos anteriores, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es HIC en condiciones no desnaturalizantes. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico. En realizaciones relacionadas, el espectrómetro de masas es un ESI-MS. En algunas otras realizaciones relacionadas, el conjugado de una proteína con un agente se introduce continuamente en un espectrómetro de masas.

60 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento en el que el conjugado de una proteína con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, el conjugado se puede introducir de manera continua. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento en el que el conjugado de una proteína con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, el conjugado se puede introducir continuamente.

65 En otro aspecto de los métodos anteriores, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el

compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC, y el espectrómetro de masas es un ESI-MS. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

- 5 En un aspecto de los métodos anteriores, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el
10 compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es HIC en condiciones no desnaturalizantes. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el espectrómetro de masas puede incluir un ESI-MS.

- 15 En otro aspecto de los métodos anteriores, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el
20 compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC, y el espectrómetro de masas es ESI-MS. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

- La presente divulgación proporciona métodos en los que el medio de separación es SEC, el conjugado de proteína se introduce en un espectrómetro de masas, el espectrómetro de masas es un ESI-MS, y la masa del compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente intacto se mide directamente y la masa del compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente se cuantifica. En otro aspecto, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, que no está desnaturalizado se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un
30 agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico. En otras realizaciones relacionadas, el medio de separación es HIC en condiciones no desnaturalizantes.

- 35 En un aspecto, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, el conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por
40 lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC, la columna de SEC es de silicio, poliestireno-divinilbenceno o polihidroxietil-aspartamida, y el compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, y la masa del compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente intacto se mide directamente. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato
45 amónico, o en acetato amónico.

- En un aspecto de los métodos anteriores, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, el conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC. En realizaciones relacionadas la columna de SEC es de sílice. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico. En otras realizaciones relacionadas, la SEC incluye
55 poliestireno-divinilbenceno.

- En cualquiera de los métodos del presente documento en los que el conjugado de anticuerpo con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, y la masa del compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente intacto se mide directamente, los métodos pueden incluir adicionalmente que el compuesto de conjugado de una
60 proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC, y la columna de SEC es de polihidroxietil-aspartamida. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato
65 amónico, o en acetato amónico.

En cualquiera de los métodos del presente documento en los que el conjugado de anticuerpo con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, y la masa del compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente intacto se mide directamente, los métodos pueden incluir adicionalmente los siguientes aspectos. En otro aspecto, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC, y la columna de SEC es de polihidroxietil-aspartamida. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

En realizaciones relacionadas, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, el conjugado de una proteína con un agente opcionalmente está desglicosilado, el conjugado de una proteína con un agente no está desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, el medio de separación es SEC, y la columna de SEC es de sílice, poliestireno-divinilbenceno o polihidroxietil-aspartamida. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico, en formato amónico, o en acetato amónico.

En otro aspecto de los métodos en los que el conjugado de anticuerpo con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, y la masa del compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente intacto se mide directamente, los métodos pueden incluir los siguientes aspectos. En otro aspecto, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, el conjugado de una proteína con un agente en un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente está desglicosilado, el conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, el medio de separación es SEC, y la columna de SEC es de sílice, poliestireno-divinilbenceno o polihidroxietil-aspartamida. En realizaciones relacionadas el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, es no desnaturalizado. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico y la concentración de carbonato amónico está entre 50 y 400 mM. En otras realizaciones, el conjugado de proteína con una agente está en formato amónico y la concentración de formato amónico está entre 50 y 400 mM.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden proporcionar que el conjugado de una proteína con un agente está en carbonato amónico y la concentración de carbonato amónico está entre 50 y 400 mM. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden proporcionar que el conjugado de una proteína con un agente está en acetato amónico y la concentración de acetato amónico está entre 50 y 400 mM. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden proporcionar que el conjugado de una proteína con un agente está en formato amónico y la concentración del formato amónico está entre 50 y 400 mM.

En otro aspecto de los métodos en los que el conjugado de proteína se introduce en un espectrómetro de masas, y la masa del compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente intacto se mide directamente, los métodos pueden incluir los siguientes aspectos. En un aspecto el medio de separación tiene condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz y se aplica para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, el medio de separación es SEC. En realizaciones relacionadas la columna de SEC es de sílice, poliestireno-divinilbenceno o polihidroxietil-aspartamida. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden proporcionar que el conjugado de una proteína con un agente esté en carbonato amónico y la concentración de carbonato amónico sea de entre 50 y 400 mM. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden proporcionar que el conjugado de una proteína con un agente esté en acetato amónico y la concentración de acetato amónico sea de entre 50 y 400 mM. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden proporcionar que el conjugado de una proteína con un agente esté en formato amónico y la concentración de formato amónico sea de entre 50 y 400 mM.

En realizaciones relacionadas, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, el conjugado de una proteína con un agente es no desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC, y la columna de SEC es de sílice, poliestireno-divinilbenceno

o polihidroxietil-aspartamida. En realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de entre 50 y 400 mM y el pH es de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de entre 50 y 400 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de entre 50 y 400 mM y el pH de 6,5. En otras

- 5 realizaciones relacionadas, el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5.
- 10 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden incluir opcionalmente que el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de 50 mM y el pH de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de 50 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de 50 mM y el pH de 6,5.
- 15 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden incluir opcionalmente que el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de 150 mM y el pH de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de 150 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de 150 mM y el pH de 6,5.
- 20 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden incluir opcionalmente que el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5.
- 25 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los métodos pueden incluir opcionalmente que el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de 400 mM y el pH de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de 400 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de 400 mM y el pH de 6,5.
- 30 En otro aspecto de los métodos del presente documento en los que el compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, la masa del compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente intacto se mide directamente, y el espectrómetro de masas es un ESI-MS, los métodos pueden incluir los siguientes aspectos. En un aspecto, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente y no está desnaturalizado. En realizaciones relacionadas, el
- 35 conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5.
- 40 En otro aspecto de los métodos del presente documento en los que el compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, la masa del compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente intacto se mide directamente, y el espectrómetro de masas es un ESI-MS, los métodos pueden incluir los siguientes aspectos. En un aspecto, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, el conjugado de una proteína con un agente no está desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un
- 45 anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC, y la columna de SEC es de polihidroxietil-aspartamida. En realizaciones relacionadas el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de
- 50 250 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5.
- 55 En otro aspecto de los métodos del presente documento en los que el compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, la masa del compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente intacto se mide directamente, y el espectrómetro de masas es un ESI-MS, los métodos pueden incluir los siguientes aspectos. En un aspecto, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente y no está desnaturalizado, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el
- 60 compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, y el medio de separación es SEC, y la columna de SEC es de polihidroxietil-aspartamida. En realizaciones relacionadas el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5.

65

En algunos métodos del presente documento en los que el compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, el medio de separación es SEC, y la columna de SEC es de polihidroxietil-aspartamida. En realizaciones relacionadas el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5.

En otro aspecto de los métodos del presente documento en los que el compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente se introduce en un espectrómetro de masas, la masa del compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente intacto se mide directamente, y el espectrómetro de masas es un ESI-MS, los métodos pueden incluir los siguientes aspectos. En un aspecto de un método descrito en el presente documento, el compuesto de conjugado de una proteína con un agente es un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente, el agente es un fármaco, se aplica un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para el compuesto de conjugado de un anticuerpo y un agente en una matriz para efectuar la separación del compuesto de complejo de un anticuerpo con un agente de la matriz, por lo que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un agente está sustancialmente no desnaturalizado, el medio de separación es SEC, y la columna de SEC es de polihidroxietil-aspartamida. En realizaciones relacionadas el conjugado de proteína con un agente está en formato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, el conjugado de proteína con un agente está en carbonato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5, o el conjugado de proteína con un agente está en acetato amónico a una concentración de 250 mM y el pH de 6,5.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen la rápida determinación de la masa intacta de los compuestos de conjugado de una proteína con un agente asociados no covalentemente. En una realización un compuesto de un conjugado de anticuerpo con un agente de cadenas pesadas (HC) y cadenas ligeras (LC) están presentes como un complejo como resultado de la reducción del anticuerpo y la conjugación posterior de un fármaco en los restos de cisteína intercatenarios. Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir la etapa de analizar el ADC utilizando condiciones de desalación nativas, en las que la estructura bivalente e intacta del ADC se mantiene. Realizaciones adicionales incluyen la etapa en la que la masa del ADC desalado se determina posteriormente utilizando condiciones de desolvatación e ionización. En algunas de estas realizaciones, las condiciones de desolvatación e ionización son condiciones convencionales de desolvatación e ionización.

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir el análisis de ADC con cisteinilos unidos presentando un método de medición de masa y desalación basado en cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) semi-nativa. El método puede incluir también la medición de la masa intacta de los ad con cisteínas intercatenarias unidas, y la cuantificación de la distribución relativa de especies con fármacos unidos por intensidad iónica desglosada. El método descrito en el presente documento se puede adaptar para la determinación de masas de ADC de alto rendimiento.

El método descrito en el presente documento puede incluir la etapa opcional de desglicosilación del ADC. La etapa de desglicosilación puede incluir el uso de PNGasa F u otros compuestos conocidos por el experto en la técnica. Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir la etapa de eliminación de la heterogeneidad de glicanos. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionan una intensidad de señal mejorada, aumentada o mayor de cada especie de fármaco cargado. En realizaciones adicionales, los métodos incluyen la etapa de cuantificación. La presente divulgación proporciona métodos en los que la desglicosilación permite una mejor precisión de masas debido a una intensidad de señal de MS aumentada.

Además de la desglicosilación opcional, el método del presente documento puede incluir una etapa de un medio de separación. La etapa del medio de separación incluye distintas técnicas cromatográficas, por ejemplo SEC o HIC. En esta etapa el ADC se intercambia de un sistema de tampón a una sal volátil que soporta la carga positiva de aminoácidos básicos para la medición de la masa. En algunas de estas realizaciones, se eliminan las sales no volátiles, tensioactivos y tampones del ADC. En otras realizaciones, la etapa cromatográfica se lleva a cabo utilizando la SEC en condiciones no desnaturalizantes, mientras se permite un intercambio de tampón del ADC en una sal volátil.

El método que se expone en el presente documento puede incluir una etapa de espectrometría de masas. En ciertos aspectos, la MS puede ser inmediatamente a continuación de la etapa de medio de separación. En otros aspectos, puede haber etapas de intervención entre la etapa de medio de separación y la de MS. En otros aspectos más, la etapa de MS puede ser continua a continuación de la etapa de medio de separación. En la etapa de MS, la masa del ADC se mide. Adicionalmente, los métodos expuestos en el presente documento pueden proporcionar que se determina la carga cuantitativa de fármaco mediante una MS de abundancia de iones. En un aspecto, la MS se lleva a cabo en un a TOF-MS, una Q-TQF, FTICR, Orbitrap, o MS de trampa de iones de alta resolución. En esta etapa, la masa se mide con un espectrómetro de masas de alta resolución y los datos de múltiple carga (m/z) se desglosa a espectro de masas de carga cero. Las especies cargadas de fármacos individuales se cuantifican basándose en la intensidad iónica del espectro desglosado que es un producto de la intensidad de los datos en bruto sin procesar. Los datos de ESI-MS en bruto de las proteínas se visualiza normalmente como una serie de iones cargados en los que una única especie molecular puede tener varios iones asociados con ella y cada uno de los iones relacionados

se diferenciará en el número de cargas positivas. El desglose de los datos en bruto se refiere a que el procedimiento de determinación del número de cargas de cada ion se lleva a cabo y se convierten todos los iones relacionados en un espectro de masas de carga cero que representa en peso molecular de las especies que se están analizando. Cada ion en los datos en brutos que se relaciona con una especie particular en el espectro de masas desglosado tiene una medida de intensidad o abundancia asociada con él, y la abundancia de todos los iones asociados con una especie en particular constituye de esta manera una aproximación de la abundancia de esta especie en la muestra que se analiza. Cuando se cuantifican las especies, la abundancia de una especie particular en una muestra se compara con la suma de la abundancia de todas las especies relacionadas en la muestra dando así una medida de la abundancia molar relativa de esa especie en particular. La cuantificación de esta manera asume en ciertos casos, que todas las especies tienen aproximadamente una eficacia de ionización equivalente.

III. Farmacocinética

Es necesario el control de los niveles circulantes de un agente terapéutico para las determinaciones farmacocinéticas (PK) en un mamífero, que incluyen la semivida, aclaramiento, área bajo la curva (AUC), y volumen de distribución, para establecer los límites de seguridad/toxicidad y régimen de dosificación apropiados (Welling, P. (1997) *Pharmacokinetics Processes, Mathematics, and Applications*, 2ª Ed., American Chemical Society, Washington, D.C.). La biodisponibilidad es la extensión hasta la cual el compuesto administrado alcanza la circulación general a partir de la forma de dosis administrada, habitualmente se expresa como un porcentaje de la dosis administrada. La semivida de un compuesto es el tiempo necesario para la eliminación del 50% de la concentración pico en el plasma del compuesto 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 aclaran la absorción, distribución, metabolismo, y excreción (ADME) de los conjugados de un anticuerpo con un fármaco (ADC).

IV. Carga del fármaco

El número medio de fármacos por anticuerpos en las preparaciones de ADC a partir de las reacciones de conjugación se puede caracterizar por los métodos de la presente divulgación. Los métodos pueden determinar la cantidad de fármaco unido por anticuerpo (carga) de un ADC y la distribución de restos de fármaco o fragmentos tales como una cadena pesada y una cadena ligera.

V. Administración de conjugados de anticuerpo con un fármaco

Los ADC se pueden poner en contacto con, o administrarse en, fuentes biológicas por cualquier vía apropiada a la afección que se va a tratar. El ADC se administrará normalmente a un mamífero por vía parenteral, por ejemplo, en infusión, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

VI. Fármacos adecuados para su uso en los métodos descritos en el presente documento

Los fármacos a modo de ejemplo para la conjugación con un anticuerpo incluyen fármacos o agentes citotóxicos particularmente los que se utilizan en la terapia del cáncer. Dichos fármacos incluyen, en general, agentes que dañan el ADN, anti-metabolitos, productos naturales y sus análogos. Las clases a modo de ejemplo de agentes citotóxicos incluyen los inhibidores enzimáticos, tales como los inhibidores de dihidrofolato reductasa, e inhibidores de timidilato sintasa, intercaladores de ADN, cortadores de ADN, inhibidores de topoisomerasa, familia de fármacos de antraciclina, fármacos de la vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, nucleósidos citotóxicos, familia de fármacos de pteridina, dinenos, podofilotoxinas, las dolastinas, los maitansinoides, inductores de diferenciación, y taxoles. Los restos farmacológicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: auristatinas (tales como MMAF y MMAE), metotrezato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, arabinósido de citosina, melfalan, leurosina, leurosídeína, actinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C, mitomicina A, maitansinoides, carmomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina, y derivados de la podofilotoxina tales como etopósido o fosfato de etopósido, vinblastina, vincristina, vindesina, taxol, taxotero, ácido retinoico, ácido butírico, camptotecina, caliqueamicina, espiromicina, enedinas, y sus derivados y análogos.

El resto farmacológico de un ADC también puede incluir dolastatina y sus análogos peptídicos y derivados, las auristatinas (Pat. de EE. UU. N.º 5.635.483; 5.780.588). Se ha demostrado que las dolastatinas y auristatinas interfiere con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP, y división nuclear y celular (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividades anticáncer (Pat. de EE. UU. N.º 5.663.149) y antifúngicas (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). En algunas realizaciones, el fármaco es una auristatina, un agente anti-tubulina. El resto farmacológico de dolastatina o auristatina se puede unir al anticuerpo mediante el extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto farmacológico peptídico (documento WO 02/088172). Las variantes de auristatina E se desvelan en la Pat. de EE. UU. N.º 5.767.237 y Pat. de EE. UU. N.º 6.124.431.

Los inmunconjugados de MMAE y MMAF, su síntesis y estructura se desvelan en las Patentes de EE. UU. N.º 7.851.437; 7.829.531; 7.659.241; 7.498.298; 7.994.135; 7.964.567; cada una de las cuales se incorpora en el

presente documento por referencia en su totalidad y para todos los fines. Las auristatinas incluyen pero no se limitan a la auristatina E y derivados de la misma. AFP, AEB, AEVB, MMAF, y MMAE son ejemplos de auristatina que se pueden utilizar en el presente documento.

5 VII. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de los ADC terapéuticos se preparan normalmente para su administración parenteral, por ejemplo, en embalada intravenosa, inyección intratumoral como un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en una forma de dosificación unitaria inyectable. Un conjugado de un anticuerpo con un fármaco (ADC) que tenga el grado deseado de pureza se mezcla opcionalmente con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16ª edición, Osol, A. Ed.), en forma de una formulación liofilizada o una solución acuosa.

Los diluyentes, vehículos, excipientes y estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores de la fuente biológica a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tapones tales como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol bencílico o butílico; alquil parabenos tales como el metil o propil parabeno; catecol, resorcinol, ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo goma guar y dextrinas; azúcares tales como glucosa, manosa, sacarosa, manitol, trealosa o sorbitol; agentes quelantes tal como EDTA; contraiones formadores de sales tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tal como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

VIII. Desglicosilación

La etapa opcional de desglicosilación se emplea para reducir la heterogeneidad que resulta de la extensión variable de restos de ácido siálico y galactosa en los N-glicanos. La heterogeneidad del extremo N de glicanos se puede reducir con un tratamiento enzimático con exoglicosidasa (por ejemplo, sialidasa y beta-galactosidasa, respectivamente) o por tratamiento con una endoglicosidasa con enzimas que eliminan el N-glicano del resto de Asn ocupado (por ejemplo, PNGasa-F) o enzimas que escinden entre el 1º y el 2º resto de N-acetilglucosamina en los N-glicanos (por ejemplo, Endo-F1, F2 o F3).

En un aspecto, la manera más simple y más eficaz de reducir la heterogeneidad de los N-glicanos es digerir con PNGasa-F. La etapa de desglicosilación es opcional ya que la cuantificación es aún posible dejando los glicanos intactos. Sin embargo, el espectro de MS se complica innecesariamente y será necesario un espectrómetro de masas de alto final para una cuantificación reproducible.

IX. Cromatografía

La retirada de sales no volátiles y tensioactivos iónicos y no iónicos de las muestras proteicas se produce antes de la medición de masa. En una realización, el ADC se introduce en el espectrómetro de masas y está libre de sales no volátiles. En otra realización, el ADC se introduce en el espectrómetro de masas y está sustancialmente libre de sales no volátiles. En otra realización más, el ADC se introduce en el espectrómetro de masas y está libre de sales no volátiles, con la excepción de tensioactivos, por ejemplo, Las técnicas de desalado de ADC unido a cisteína deben mantener la estructura proteica nativa intacta mientras se eliminan también las sales no iónicas y los tensioactivos. Los tipos de columna cromatográfica que pueden desalar y conservar la estructura nativa en sistemas de tampón compatibles con MS incluyen la exclusión por tamaño (SE) y columnas HIC. Se prevé que se pueden utilizar las columnas que no están marcadas como columnas SEC, por ejemplo, las columnas HIC, en un modo tipo SEC. Las columnas se ejecutarían, por ejemplo, en tampón de acetato amónico isocrático. La columna opera de dicha manera que prohíbe que entre la proteína en los poros del medio cromatográfico mientras que permite que las sales no volátiles entren en los poros del medio cromatográfico causando así que la proteína se eluya primero en las condiciones del móvil y las sales se eluyen después. La migración de las sales no volátiles está retardada con respecto a la migración de la proteína.

Las columnas SEC emplean un medio cromatográfico que se compone normalmente de una fase estacionaria de sílice, poliestireno-divinilbenceno o polihidroxietil-aspartamida en forma de partículas que varían de tamaño des 1,7 a 20 micrómetros de diámetro con tamaños de poro que varían desde 60 a 2000 angstroms. En un aspecto, los poros tienen 60, 80, 100, 120, 150, 200, 300, 500, 1000, 2000, o 4000 Å. En un aspecto, se puede utilizar cualquier material empaquetado en una columna SEC y tamaños de columna que pueden ser desde 0,1 a 7,8 mm de diámetro interno y 50 a 600 mm de longitud. Los tamaños de columna pueden ser de 0,1, 0,15, 0,3, 0,5, 1, 2,0, 2,1, 3,0, 4,0, 4,6 o 7,8 mm. Las longitudes de columna pueden ser 50, 100, 150, 200, 250, 300 mm.

Esta clase de columnas elimina las sales no volátiles y tensioactivos de las proteínas debido a la inmensa diferencia de tamaño de una con respecto a la otra. Específicamente, las sales de molécula pequeña y los tensioactivos interactúan (por ejemplo, entran en los poros de las partículas cromatográficas que hace que estas especies que se van a retrasar en su pasaje a través de la columna mientras que las proteínas de tamaño suficiente no interactúan con la estructura porosa de las partículas y así se eluyen bien antes las sales no volátiles y tensioactivos. Otro aspecto de un sistema de desalación es la elección de una sal tampón y el pH y la concentración de la sal. La sal tampón debería ser volátil para evitar la cristalización y corrosión de la entrada de MS. Las sales volátiles tampón de MS que se utilizan comúnmente son formato amónico/ácido fórmico y acetato amónico/ácido acético (por ejemplo, pares de ácido/base). Por ejemplo, las columnas se podrían lavar con acetato amónico a pH 7 y se titulan a un pH de 6,5 con ácido acético. En un aspecto, la sal es acetato amónico.

La concentración de las sales es entre 50 y 400 mM. En un aspecto, la concentración de sal es de 200 mM. En otro aspecto, la concentración de sal es de 250 mM. El pH del tampón está entre 5,0 y 7,0. En un aspecto, el pH es desde 5,5 a 7,0. En otro aspecto, el pH es 6,5. En otro aspecto más, el pH es 7,0. Un experto en la técnica entiende que el intervalo de pH se prevé que daría como resultado datos de masas útiles (por ejemplo, se pueden obtener datos útiles de masas a un pH de 7,5 u 8,0).

La desnaturalización y la fragmentación consiguientes de un ADC puede evitarse si se produce el análisis en ausencia de disolventes orgánicos y reactivos ácidos de emparejamiento. En un aspecto, 200 mM de acetato amónico a un pH de 6,5, utilizados en conjunción con una columna poli hidroxietil-A proporciona la desalación de un mAb IgG1 desglucosilada.

X. Espectrometría de masas

En un procedimiento de MS, se carga una muestra en el instrumento de MS. La muestra contiene un compuesto de conjugado de una proteína con un agente. La muestra se ioniza con un ácido o base para la ionización de MS negativa o positiva, respectivamente. La muestra entra en el curso como una pulverización fina o gotículas. La muestra que contiene gotículas está desolvatada (evaporada) con un gas secante calentado. El tamaño de las gotículas disminuye hasta el punto en el que las moléculas proteicas cargadas positivamente hacen que las gotículas exploten en gotículas más pequeñas debido a repulsiones electrostáticas. Este procedimiento se repite muchas veces en una segunda división hasta que tenga iones proteicos en fase gaseosa verdadera que posteriormente entran en el espectrómetro de masas para la determinación de la masa. A este procedimiento se hace referencia normalmente como ionización por electropulverización (ESI). La relación de masa respecto a carga (m/z) de los iones moleculares se determinan y estos datos en bruto se procesan adicionalmente (se desglosan) con el software específico del vendedor para dar lugar a una masa molecular de carga cero del analito de interés. La MS se utiliza para estudiar la farmacocinética, identifica una proteína o pequeñas moléculas desconocidas y caracteriza las modificaciones y degradaciones post-traduccionales que se producen en las proteínas. La instrumentación ESI típica incluye agua Xevo Q-TOF, Agilent 6510 Q-TOF.

Los datos espectrométricos se utilizan para confirmar la estructura primaria de las proteínas. La confirmación de la estructura primaria se obtiene cuando la masa medida experimentalmente de una proteína coincide con la masa teórica, que se determina de la secuencia de aminoácidos esperada, con un umbral de error determinado. La medición de masa intacta de los mAb recombinantes se puede llevar a cabo utilizando espectrómetros de masas con tiempo de vuelo disponibles en el mercado. Los procedimientos de desalado típicos que utilizando sistemas de disolvente desnaturalizantes a menudo dan lugar a datos experimentales de masa para los mAb que están en 50 ppm (aproximadamente 7,5 Da) del valor teórico. En otros aspectos, los datos de masas están aproximadamente en 25 Da. La desalación nativa de mAb y ADC utilizando SEC-MS en un sistema de tampón de acetato amónico da como resultado eficacias de ionización menores debido a que menos restos básicos están cargados positivamente en un tampón de pH neutro. Los datos en bruto de intensidad menor pueden resultar en una desviación mayor de la masa mediada experimentalmente de la masa teórica. No obstante los datos experimentales obtenidos en ADC desalados utilizando SEC-MS descritos en el presente documento dan lugar a datos de masa que están en 50 ppm (aproximadamente 7,5 Da) del valor teórico y siempre menos de 100 ppm. El alto grado de precisión de masa indica que el ADC está completamente desalado ya que los aductos de sal comunes que pueden asociarse potencialmente con la proteína aumentarían la masa en al menos 18 Da (la masa de un ion amonio). Las estrategias convencionales para medir la masa de los ADC con subunidades unidas covalentemente implican la desalación mediante técnicas fuera de línea tal como filtración en centrífuga, uso único de cartuchos de geles de penetración y diálisis seguido por MS con nanopulverizador del ADC desalado. La desaducción incompleta de la muestra es bastante común utilizando esta estrategia y puede dar como resultado los datos de masa que se desvía del valor teórico por hasta 5000 ppm.

Con la elución de la proteína, por ejemplo, un ADC, de la columna de SEC en una sal volátil, por ejemplo, acetato amónico, la proteína se introduce en el espectrómetro de masas utilizando fuentes de ESI analítica disponibles capaces de desolvatar e ionizar proteínas en un tampón que está fluyendo entre 1 y 1000 micrólitros/minuto. Los caudales se pueden determinar por el operador y pueden depender del diámetro de columna. Por ejemplo, una columna de 0,1 mm podría operarse con un caudal de 1 micrólitro/min y una de 7,8 mm se pueden operar a alrededor de 1000 micrólitros/min. Este caudal permite una determinación de la masa mucho más rápida. La tensión capilar, velocidad de flujo de gases (desolvatación y cubierta) y las tensiones en cono se deberían fijar en valores

que sean suficientes para desolvatar (por ejemplo, evaporar el disolvente) el ADC pero lo suficientemente suave para minimizar la fragmentación en curso del ADC en cadenas pesadas y ligeras unidas a un fármaco. Cuando la estructura plegada nativa del ADC se mantiene, entonces es evidente que los datos en bruto como una envoltura de carga entre 4800 y 7000 m/z. Si la estructura nativa no se mantiene entonces es evidente que una población de ADC significativa que tiene una envoltura de carga entre 2000 y 4000 m/z. Los datos en bruto de la medición por MS de ADC se convierte en un espectro de masas de carga cero utilizando un software de desglose (por ejemplo, desglose de entropía máxima Agilent MassHunter) y las abundancias de cada especie de fármaco se cuantifica dividiendo la abundancia de iones de una especie de fármaco unida particular por el total de abundancia de iones (sumada la abundancia de todas las especies de fármaco unidas). La medición de masas de proteínas intactas se lleva a cabo en instrumentos con tiempo de vuelo y tiempo de vuelo tetrapolar (TOF y QTOF, respectivamente) pero también se puede llevar a cabo por resonancia de ciclotrón iónica transformada de Fourier (FT-ICR) y espectrómetros de masas orbitrap. En un aspecto, este trabajo se podría llevar a cabo en un espectrómetros de masas con desorción/ionización de matriz asistida por láser (MALDI) y espectrómetros de masas con trampa de iones de alta resolución.

Al contrario que la presente divulgación, previamente cada fracción recolectada previamente de la etapa de cromatografía se introdujo individualmente en la MS. Ensayando la masa de cada fracción constituyente de los compuestos y conjugados, la suma de la masa de todos los picos recolectados se calculó para determinar la masa total. Como se expone en el presente documento, la presente divulgación proporciona métodos que analizan los ADC intactos directamente por MS.

XI. Espectrometría de masas con ionización por electropulverizador

Las masas de compuestos de relativamente alto peso molecular tales como los anticuerpos se pueden detectar a relaciones masa respecto a carga (m/z) que se determinan fácilmente por la mayoría de los espectrómetros de masas (los intervalos típicos de m/z) de hasta 2000, hasta 3000, hasta 8000). La espectrometría de masas con ionización por electropulverizador ESI-MS, en particular, es adecuada para compuestos cargados, polares o básicos y para el análisis de compuestos marcados múltiples con límites de detección excelentes. El ESI permite así la detección y caracterización de grandes biomoléculas, tales como conjugados de un anticuerpo con un fármaco con un peso molecular (PM) de 150.000 o más.

XII. Sistemas

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un sistema configurado para llevar a cabo un método descrito en el presente documento. En algunas de estas realizaciones, los sistemas incluyen un espectrómetro de masas.

En ciertas realizaciones, el espectrómetro de masas se configura para llevar a cabo un método descrito en el presente documento e incluye un medio para la detección de una masa de un conjugado de una proteína con un agente asociado no covalentemente. En ciertas realizaciones, el medio incluye un espectrómetro de masas. En algunas realizaciones, los sistemas incluyen adicionalmente medios para proporcionar un compuesto de conjugado de una proteína con un agente no desnaturalizado en una sal volátil y libre de una sal no volátil. En realizaciones adicionales, los sistemas incluyen medios para la introducción del compuesto de conjugado de una proteína con un agente en un espectrómetro de masas. En más realizaciones adicionales, los sistemas incluyen medios para el establecimiento de la masa directamente del compuesto de conjugado de una proteína con un agente por espectrometría de masas.

XIII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos ejemplifican la invención y no se pretende que la limiten.

Materiales

Conjugados de un anticuerpo con un fármaco - Los anticuerpos monoclonales recombinantes se expresaron en células CHO y se purificaron de acuerdo con procedimientos convencionales descritos en Shukla, A et al, (2007) J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 848, 28-39. La conjugación de restos de cisteína en el mAb con Val-Cit monometil auristatina E (vcMMAE) o maleimidocaproil monometil auristatina F (mcMMAF) se llevó a cabo de acuerdo con procedimientos establecidos descritos en Sun, M. et al, (2005) Bioconjug Chem 16, 1282-1290. Los anticuerpos se desglucosilaron añadiendo 1 µl de PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, MA) por 100 µg de anticuerpo o ADN y se incubaron a 37 °C durante al menos 4 horas.

Ejemplo 1

Cromatografía de SEC-MS - Los mAb y ADC se separaron en una columna de polihidroxietil-A (PolyLC, Columbia, MD) con dimensiones de 2,1 x 200 mm y que contenía partículas de 5 micrómetros con poros de 300 Å. La columna se equilibró en 200 mM de acetato amónico, pH 6,5-7,0 para el análisis de masas no desnaturalizantes o un 30 % de

acetonitrilo, un 0,2 % de ácido fórmico para el análisis de masas desnaturalizante (control). El caudal se mantuvo a 0,1 ml/min durante la ejecución y el mAb o ADC se eluyó entre 3,5 y 4,5 min. El flujo y la composición de tampón se mantuvo siguiendo la elución del mAb o ADC y el tiempo de ciclo total era de 10 min por ejecución.

Espectrometría de masas – Los datos del espectro de masas para los mAb y ADC se adquirieron en un Agilent 6510 QTOF (Agilent, Santa Clara, CA) en modo ESI positivo en el intervalo de 1000-8000 m/z. La temperatura del gas secante era de 350 °C y un caudal para el gas de secado y una presión de gas del nebulizador que era de 12 l/h y 35 psi, respectivamente. La tensión capilar, de la RF fragmentadora y octopolar se fijaron en 5000, 450 y 350, respectivamente. Los datos en bruto se convirtieron en espectro de masas de carga cero con un algoritmo de desglose de entropía máxima con el software de estación de trabajo MassHunter versión B.03.01.

Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) – Los ADC con vcMMAE y mcMMAF se separaron por HIC de acuerdo con los métodos descritos en McDonagh, C. F. et al, (2006) Protein Eng Des Sel 19, 299-307. La cuantificación de las especies de carga de fármacos se determinó por integración de UV a 280 nm. En la Figura 6, se utilizando los datos de la HIC como una comparación de los porcentajes relativos de ADC MR0-8 determinados a partir del método de datos de masas intactos descritos en el presente documento.

Además de la Figura 6, la Tabla 1 muestra el área de abundancia iónica y los valores del área de UV HIC por MR, de especies cargadas de fármacos individuales.

Tabla 1

A	MR mcMMAF	mcMMAF IgG1 ADC-A (MS)	mcMMAF IgG1 ADC-ACHIC)
	MR-0	2,8 %	2,7 %
	MR-2	21,3 %	21,7 %
	MR-4	56,6 %	55,6 %
	MR-6	15,5 %	13,3 %
	MR-8	3,8 %	6,7 %
B	MR vcMMAE	vcMMAE IgG1 ADC-B (MS)	vcMMAE IgG1 ADC-B(HIC)
	MR-0	5,6 %	8,0 %
	MR-2	30,0 %	28,3 %
	MR-4	38,0 %	38,7 %
	MR-6	19,3 %	19,7 %
	MR-8	7,1 %	7,2 %

Una comparación de los datos en bruto de MS obtenidos de la muestra del mAb de control desalado en presencia de un 30 % de acetonitrilo, un 0,2 % de ácido fórmico con respecto a la muestra de mAb/acetato amónico desalada indicaba que la primera condición desnaturalizaba completamente el anticuerpo como se evidenciaba por la cubierta de carga, que se observaba entre 3000 y 4000 m/z, mientras que el acetato amónico desalado daba como resultado una cubierta de carga observada entre 4800 y 6800 m/z (Fig. 2, paneles A y B respectivamente). Los iones evidentes entre 200 y 3500 m/z en el panel B es la región en el que el anticuerpo desnaturalizado sería evidente son debidos a la presencia de PNGasa F que se utilizó para la desglicosilación y el detergente no iónico Tween-80. La masa desglosada del anticuerpo determinada por cualquier método estaba en 10 ppm del valor teórico (Fig. 2, paneles C y D).

El conjugado de mcMMAF de mAb-A descrito anteriormente también se analizó utilizando los métodos de desalación cromatográficos desnaturalizantes y no desnaturalizantes. La desalación del ADC en presencia de un 30 % de acetonitrilo, un 0,2 % de ácido fórmico resultaba en una envoltura de carga entre 1500 y 4000 m/z (Fig. 3, panel A). La MS desglosada estaba dominada por fragmentos de anticuerpo unidos incluyendo 1LC con 1 fármaco, 1LC1HC con 2 fármacos, 2HC con dos fármacos y 1LC2HC con un fármaco y 2LC 2HC con 0 fármacos (Fig. 3, panel C). Las condiciones de control no mostraban evidencia de la presencia de ADC-A intactos. La mismas región m/z en la MS de ADC desalado en acetato amónico (Fig. 3, panel B) también se desglosó y la fragmentación observada del ADC era mucho menor y solamente se observaron 1LC con 1 fármaco y 1LC1HC con 2 fármacos. Solo se observaban múltiples iones cardados para ADC-A en los datos en bruto para la muestra desalada de acetato amónico y se indica

que el área entre corchetes en la Fig. 3, panel B.

El análisis de los ADC mcMMAF y vcMMAE por el mismo método de desalación de acetato amónico descrito en el presente documento anteriormente resultaba en una distribución de especies con masas consistentes con, el mAb con incorporación de 0-8 fármacos. El espectro de masas intacto del conjugado de ADC-A con mcMMAF y el material parental (mAb-A) se muestran en la Fig. 4. Las intensidades iónicas relativas de las especies cargadas de un fármaco individual se cuantificaron por la abundancia iónica asociada con el espectro de masas desglosado. Una comparación de las cantidades relativas de ADC MR 0-8 determinada a partir de los datos de masas intacta y de un método ortogonal, HIC, se muestran en la Fig. 6, panel A. Se obtuvieron resultados similares en los análisis del conjugado ADC-B con vcMMAE y el material parental (mAb-B) y se muestran en la Fig. 5. La comparación de las cantidades relativas de ADC MR 0-8 se determinaron a partir de los datos de masa intactos y por HIC se muestran en la Fig. 6, panel B.

Ejemplo 2

Cromatografía de exclusión por tamaño – las muestras de ADC se analizaron fuera de línea mediante una columna de SEC dual. Dos columnas de 7,8 mm x 30 cm de TSK gel G3000SWXL empaquetada con partículas de 5 µm con poros de 250 Å. (Tosoh, JPN) se conectaron en serie. Las muestras de ADC se separaron utilizando una fase móvil que consistía en 200 mM de acetato amónico, pH 7 con un caudal de 0,8 ml/min. La absorbancia a 280 nm se utilizó para la detección de absorbancia debida a la interferencia de fondo de la fase móvil a longitudes de onda más bajas.

El efecto del método de desalación en la disociación de subunidades de ADC se evaluó recolectando el ADC de la columna de desalación, por SEC de columna dial. En referencia a la Figura 7, la comparación de los cromatogramas del análisis de SEC en columna dual del ADC desalado y el material de partida correspondiente indicaba que no había un aumento de la disociación como consecuencia del método de desalación.

Ejemplo 3

Experimento – La columna PHEA SEC se equilibró en tampón de acetato amónico a distintas concentraciones de sal que variaban de 50 mM a 400 mM. El ADC-B desglicosilado se analizó por SEC MS operada con unas concentraciones de sales en la fase móvil descritas anteriormente y los niveles relativos de MR0- MR8 se cuantificaron basándose en la intensidad iónica desglosada descrita previamente.

Resultados – A una concentración de sal de 50 mM los niveles de MR2 y MR6 parecen estar sobre y bajo-representados con respecto a los niveles observados en todas las otras concentraciones de sal. Esto sugeriría que la concentración de acetato amónico de la fase móvil de SEC-MS debería estar por encima de 50 mM y que la concentración de sal de acetato amónico de la fase móvil entre 100 y 400 mM no produce resultados ampliamente dispares con respecto a la distribución de MR relativa.

La Figura 8 ilustra que el cambio de concentración del acetato amónico en la fase móvil no tiene impacto en la distribución relativa de formas de fármaco cargado individuales cuando la concentración de sal está entre 100 y 400 mM.

Ejemplo 4

Experimento – El ADC-C es una molécula de IgG1 conjugada con mc-MMAF. Las distintas formas de (fármaco cargadas se separaron y purificaron mediante cromatografía de HIC (Fig. 9A). Las fracciones purificadas, así como el material de partida del ADC-C (antes de la separación con HIC) se evaluaron posteriormente por SEC-MS como se había descrito anteriormente (Fig. 9B).

Resultados – Los resultados de la SEC-MS son consistentes con los datos ortogonales (separación LCMS de las cadenas ligera y pesada reducidas) demostraba que los picos A-F corresponden con distintas formas de fármacos cargados de ADC-C (Fig. 9B). Los picos de la HIC Cy D tienen la misma masa nominal y la más es consistente con especies MR4. El desglose de los datos en bruto en el intervalo de m/z bajo de 1500-4000 (Fig. 10) indica que el pico C está compuesto primariamente por MR4 con fármacos incorporados en el Fab de anticuerpo como se evidencia por el dímero LC y HC unidos a fármacos con 2 fármacos. Un análisis similar del pico D de HIC indica que está compuesto primariamente de MR4 con fármacos incorporados en la bisagra del anticuerpo como se evidencia por la HC-LC covalente con 2 fármacos. Basándose en la información obtenida del análisis de las cadenas de anticuerpo disociadas, es posible determinar las identidades de los isómeros posicionales de MR4 separados por HIC en los picos Cy D.

La Figura 9 muestra los resultados de una caracterización de la separación de un ADC con mcMMAF por HIC (panel A), seguido por el análisis de las fracciones recolectadas por SEC-MS (panel B). En la Figura 20, un análisis de las fracciones individuales de la separación por HIC muestra que la posición de la unión del fármaco en las cadenas polipeptídicas de ADC se pueden evaluar por la masa de los fragmentos disociados utilizando SEC-MS.

Ejemplo 5

Cromatografía SEC-MS de micro flujo – Los ADC se separaron utilizando una columna de polihidroxietil-A (PolyLC, Columbia, MD) con dimensiones de 0,3 x 150 mm, que contienen partículas de 5 micrómetros con poros de 300 Å. La columna se equilibró con 200 mM de acetato amónico, pH 6,5-7,0 para el análisis de masas no desnaturalizante. La cantidad de carga de muestra en la columna variaba de 2,5 µg a 50 ng. Utilizando un dispositivo de pulverizador microflujo ESI y un controlador de LC de microflujo de retroalimentación positiva, se mantuvo el caudal a 1,0 µl/min durante 25 min en un gradiente de 200 mM de acetato amónico isocrático, con una elución de ADC observada entre 15,5 y 19,5 minutos.

Espectrometría de masas – Los datos espectrales de masas para ADC se adquirieron utilizando un Agilent 6510 QTOF (Agilent, Santa Clara, CA) en una ESI en modo positivo entre 1000-8000 m/z. La temperatura de gas secante era de 350 °C con presiones de gas de secado y nebulizador fijadas en 5,0 l/h y 15 psi, respectivamente. Todos los demás ajustes de MS eran idénticas a los experimentos a escala analítica excepto los optimizados para la interfase microflujo/microESI incluyendo la tensión capilar y las tensiones de separador que se fijaron en 3000 y 300 voltios respectivamente. Los datos en bruto se convirtieron a unidades de masa neutras utilizando un algoritmo de desglose de entropía máxima con el software de estación de trabajo MassHunter versión B.03.01.

Mientras el caudal menor retrasaba el tiempo de elución en comparación con el método analítico, el límite de detección aumentaba drásticamente, en las cuatro especies de fármaco cargadas pudiéndose visualizar hasta los 50 ng de ADC desglucosilado en la columna. Como ejemplo, para la inyección de 500 ng de ADC (Véase la Figura 11) el MRD es comparable al observado el método SEC y análisis HIC a escala analítica. La precisión de masa/error de masa observados también está sustancialmente por debajo de las especificaciones fraccionadas.

Ejemplo 6

Estabilidad del plasma/Purificación por afinidad del ADC – El plasma de ratas Sprague Dawley hembras filtrado con K2EDTA se incubó con MabSelect para agotar la IgG endógena. El ADC se añadió en el plasma de rata deficiente en IgG a 1 mg/ml, se hicieron alícuotas y se almacenaron a 37 °C. Las alícuotas se retiraron del almacenamiento a 37 °C y se almacenaron a -80 °C a los puntos de tiempo especificados (0, 6 horas, 1 día, 2 días, 4 días, 7 días) hasta el análisis. Se unieron entonces 500 µl del ADC de 1 mg/ml al MabSelect, se lavaron en 1 x PBS pH 7,4 tres veces, se eluyeron en 100 µl de tampón de elución de IgG, y se neutralizaron en 1 M de Tris pH 8 (1:10 v/v).

Cromatografía SEC-MS microflujo – Se separaron los ADC utilizando una columna de polihidroxietil-A (PolyLC, Columbia, MD) con dimensiones de 0,3 x 150 mm, que contenían partículas de 5 micrómetros con poros de 300 Å. La columna se equilibró con 200 mM de acetato amónico, pH 6,5-7,0 para el análisis de masas no desnaturalizante. Utilizando un dispositivo de controlador LC microflujo con retroalimentación positiva y un pulverizador de microflujo en ESI, se mantuvo el caudal a 1,0 pl/mi durante los 85 minutos de gradiente de acetato amónico 200 mM isocrático, con una elución observada entre 15,5 y 19,5 minutos. Aproximadamente se inyectó 1 Hg de ADC para cada adquisición.

Espectrometría de masas - Los datos espectrales de masas para ADC se adquirieron utilizando un Agilent 6510 QTOF (Agilent, Santa Clara, CA) en una ESI en modo positivo entre 1000-8000 m/z. La temperatura de gas secante era de 350 °C con presiones de gas de secado y nebulizador fijadas en 5,0 l/h y 15 psi, respectivamente. Todos los demás ajustes de MS eran idénticas a los experimentos a escala analítica excepto los optimizados para la interfase microflujo/microESI incluyendo la tensión capilar y las tensiones de separador que se fijaron en 3000 y 300 voltios respectivamente. Los datos en bruto se convirtieron a unidades de masa neutras utilizando un algoritmo de desglose de entropía máxima con el software de estación de trabajo MassHunter versión B.03.01.

El re-equilibrado de la columna se extendió a una hora después de cada inyección ADC purificado del plasma para reducir la interferencia de cualquier contaminante biológico. Esta aumentaba la señal respecto al ruido y la resolución de los picos de ADC. Los datos desglosados para el punto de tiempo cero es como se esperaba, solo con las especies cargadas pares observadas. Según aumentan los tiempos de incubación, aparecían las especies impares cargadas y aumentaban en abundancia a lo largo del tiempo (véase la Figura 12). Aunque los picos de ADC al inicio de la incubación eran los esperados, a lo largo del tiempo las colas de los picos aumentaban. Esto es debido a la heterogeneidad de la muestra total. Específicamente, cada sitio de fármaco cargado está en competición con someterse a una adición de Michal inversa o la abertura del anillo de maleimida. Esto se ha confirmado utilizando un análisis de masas reducido. La disminución en el MRD observado a lo largo del tiempo refleja la pérdida de fármaco en el plasma de rata deficiente a IgG a 37 °C.

Cuando haya un conflicto entre la presente solicitud y una referencia proporcionada en el presente documento, la presente solicitud dominará.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección o la determinación de una masa de un compuesto de conjugado de un anticuerpo y un fármaco, que comprende:
 - (a) proporcionar un compuesto de conjugado de un anticuerpo con un fármaco en una sal volátil y libre de una sal no volátil, en donde el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un fármaco tiene de uno a ocho restos de fármaco conjugados en los disulfuros intercatenarios reducidos, está asociado no covalentemente y no desnaturalizado, y mantiene su estructura de anticuerpo bivalente intacta.
 - (b) introducir el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un fármaco de la etapa a) en un espectrómetro de masas; y posteriormente
 - (c) establecer directamente la masa de la estructura bivalente intacta del compuesto de conjugado de un anticuerpo con un fármaco mediante espectrometría de masas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto de conjugado de un anticuerpo con un fármaco está presente en una distribución de compuestos de conjugados de un anticuerpo con un fármaco en una matriz; comprendiendo el método adicionalmente la aplicación de un medio de separación en condiciones no desnaturalizantes para efectuar la separación de los compuestos de conjugados de un anticuerpo con un fármaco y la matriz, en donde los compuestos de conjugados de un anticuerpo con un fármaco separados están asociados sustancialmente no covalentemente y no desnaturalizados, en donde la matriz comprende opcionalmente una sal no volátil, un tensioactivo, un tampón o una formulación, y en donde el medio de separación opcionalmente comprende una columna de HIC o SEC ejecutada en condiciones no desnaturalizantes.
3. El método de la reivindicación 2 que comprende adicionalmente la cuantificación por intensidad iónica desglosada de la distribución relativa de los compuestos de conjugados de un anticuerpo con un fármaco separados.
4. El método de la reivindicación 1 en el que la sal volátil comprende formato amónico, acetato amónico o carbonato amónico.
5. El método de la reivindicación 2, en el que las condiciones no desnaturalizantes comprenden un tampón de SEC volátil compatible con la espectrometría de masas o una temperatura no mayor de 50 °C.
6. El método de la reivindicación 2, en el que el medio de separación comprende una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), en el que la columna SEC es una columna de sílice poliestireno-divinilbenceno o polihidroxietil aspartamida.
7. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el fármaco es un maitansinoide, una auristatina, monometil auristatina E (MMAE) o monometil auristatina F (MMAF).
8. El método de la reivindicación 1, en el que la espectrometría de masas se lleva a cabo por ESI-MS.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración de la sal volátil varía desde 50 a 400 mM, y opcionalmente en el que el pH proporcionado por la sal volátil es de 5,5 a 7,0.
10. El método de la reivindicación 2, en el que los compuestos de conjugados de un anticuerpo con un fármaco se introducen inmediatamente en el espectrómetro de masas, o en el que los compuestos de conjugados de un anticuerpo con un fármaco se introducen continuamente en el espectrómetro de masas.
11. El método de la reivindicación 6, en el que el medio de la SEC comprende una columna de polihidroxietil-A opcionalmente en el que el tamaño de la columna de SEC es de 0,1 a 7,8 mm de diámetro interno y 100 a 300 mm de longitud.
12. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de tratamiento del compuesto de conjugado de un anticuerpo con un fármaco con un reactivo desglicosilante, en el que el reactivo desglicosilante comprende PNGasa F o en el que el agente desglicosilante comprende opcionalmente un tratamiento enzimático con una exoglicosidasa, un tratamiento con una endoglicosidasa o un tratamiento enzimático que escinda entre el 1º y el 2º restos de N-acetilglucosamina de los N-glicanos, en el que el tratamiento enzimático con una exoglicosidasa comprende opcionalmente una sialidasa o una beta-galactosidasa, o en el que el tratamiento enzimático que escinda entre el 1º y el 2º restos de N-acetilglucosamina de los N-glicanos comprende Endo-F1, F2 o F3.
13. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo del conjugado de un anticuerpo con un fármaco es un anticuerpo humanizado.

14. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo del conjugado de un anticuerpo con un fármaco se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD30, anti-CD40, anti-CD19, anti-CD33 y anti-CD70.

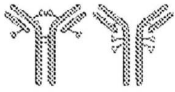
mAb ADC	Carga farmacológica
	MR = 0
	MR = 2
	MR = 4
	MR = 6
	MR = 8

FIGURA 1

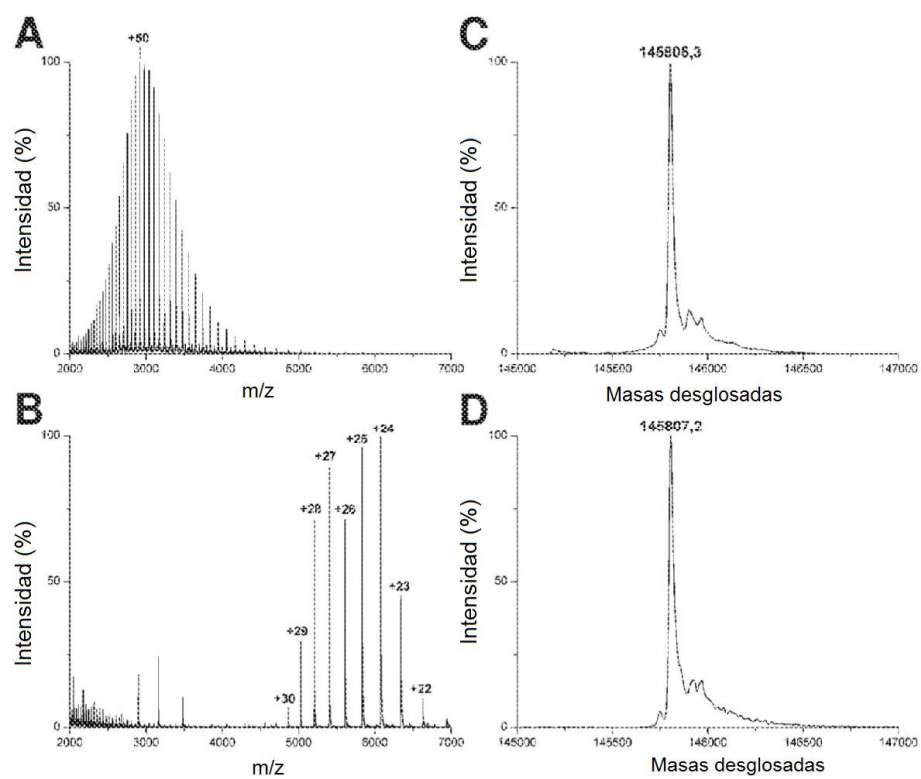


FIGURA 2

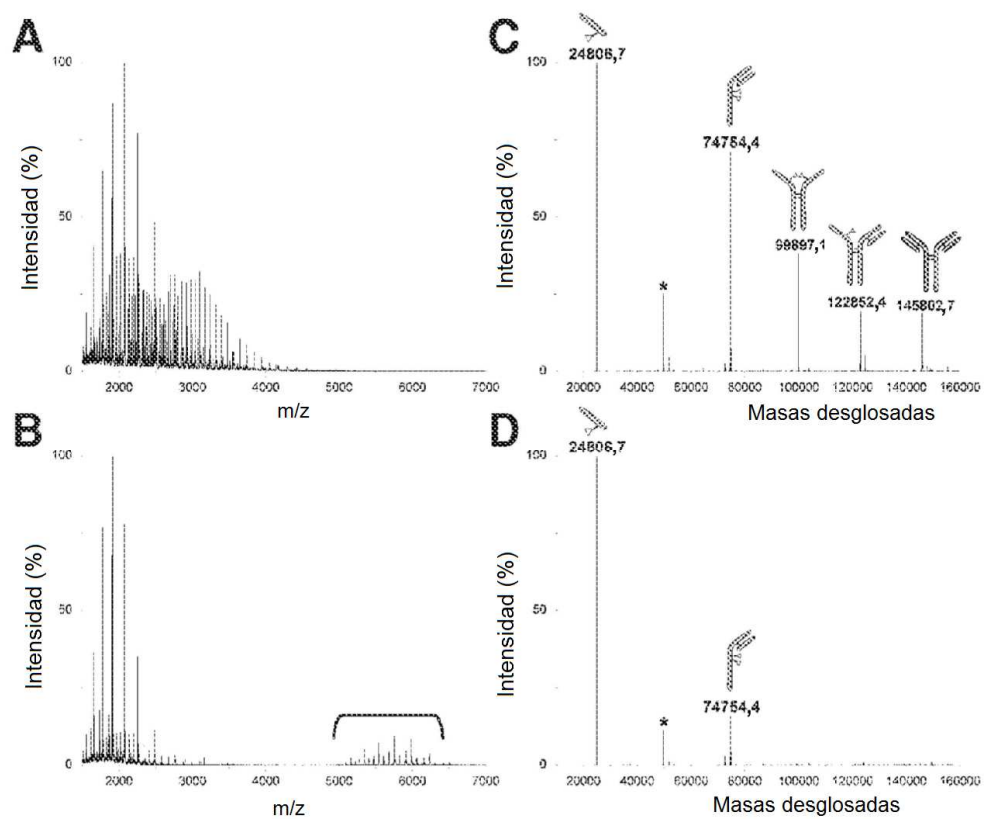


FIGURA 3

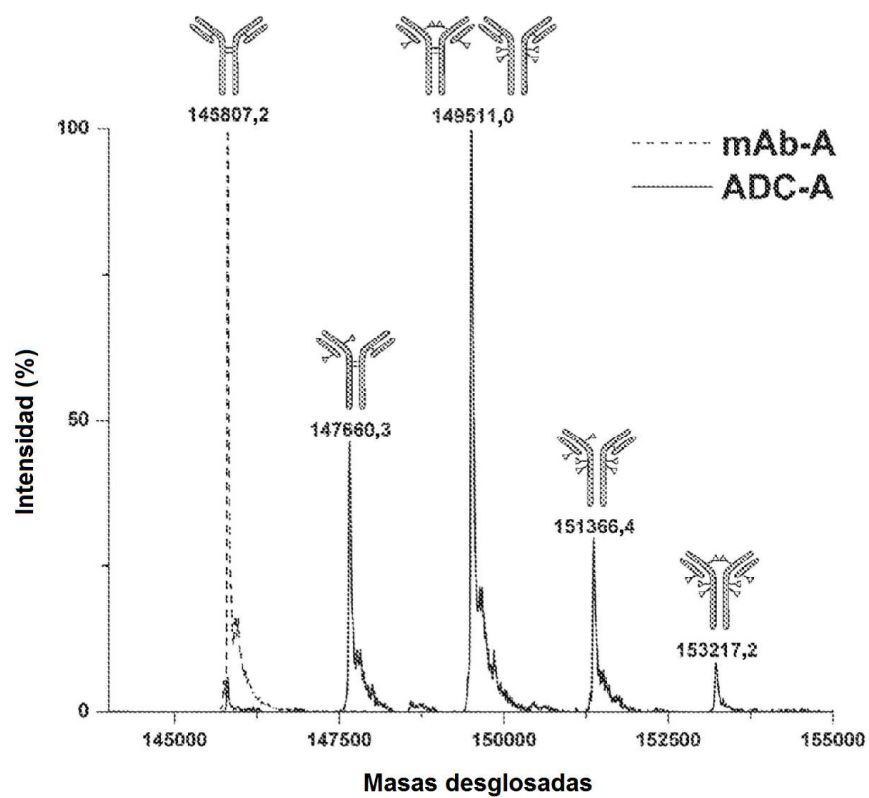


FIGURA 4

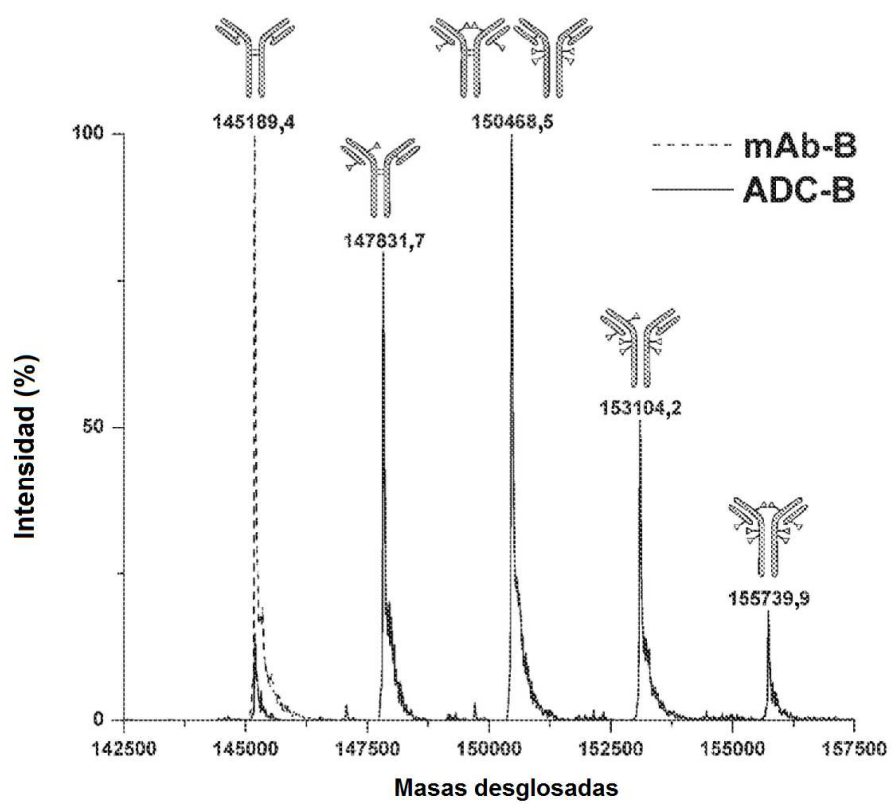


FIGURA 5

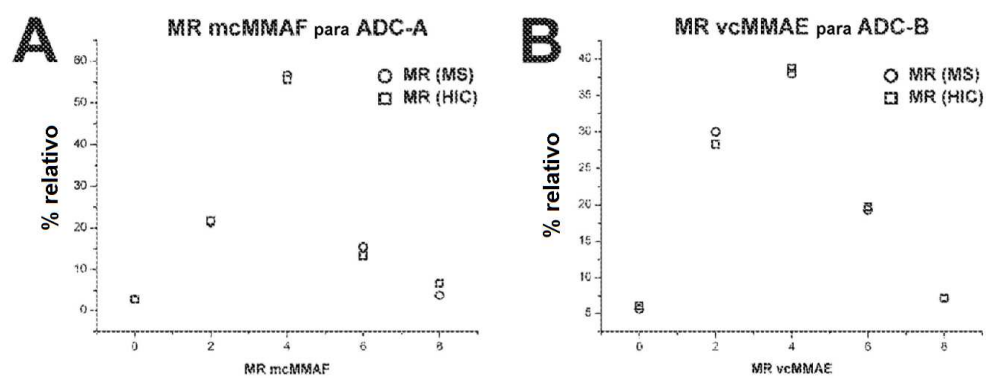


FIGURA 6

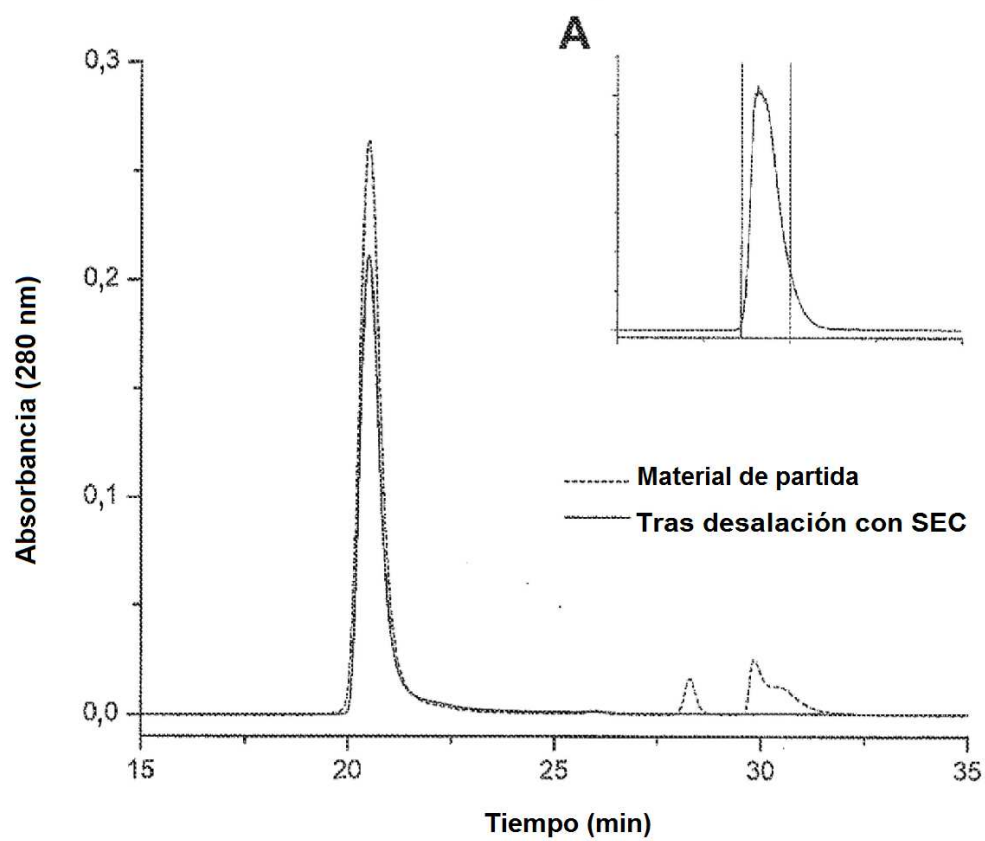


FIGURA 7

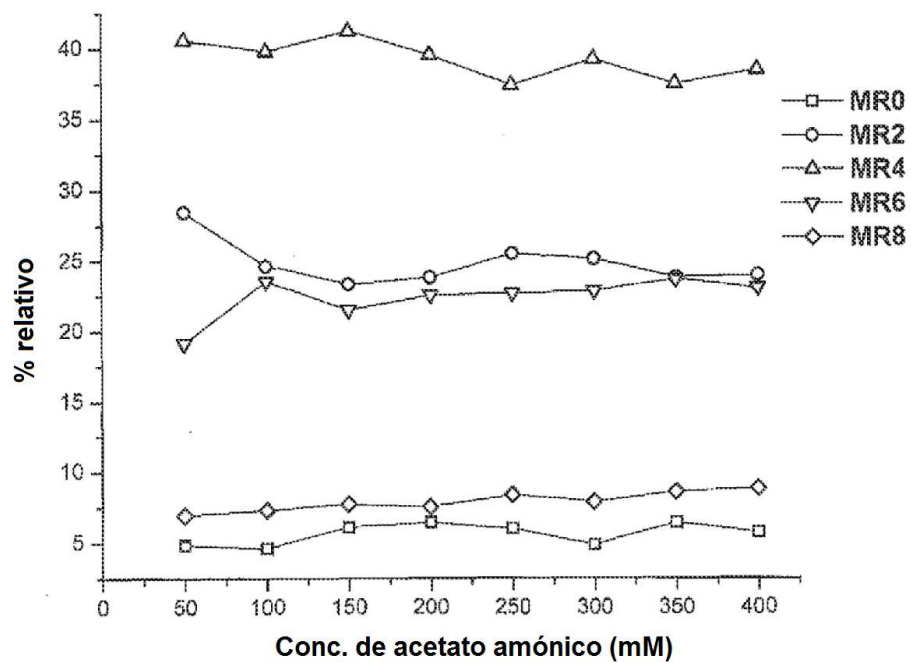
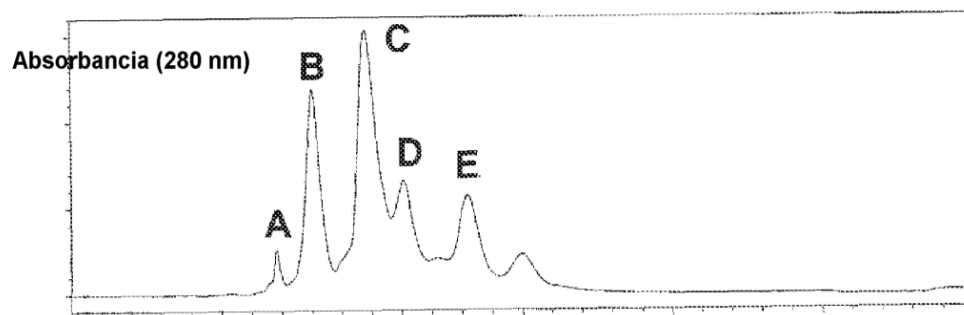
VC-MMAE MR frente a conc. de sales

FIGURA 8

A.



B.

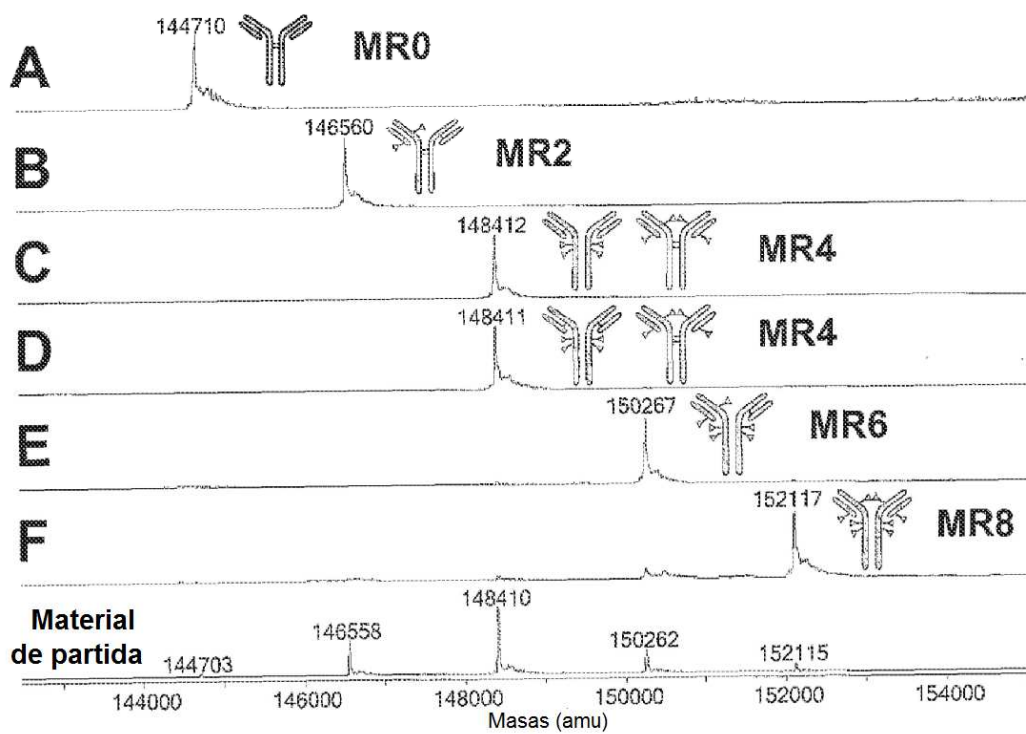


FIGURA 9

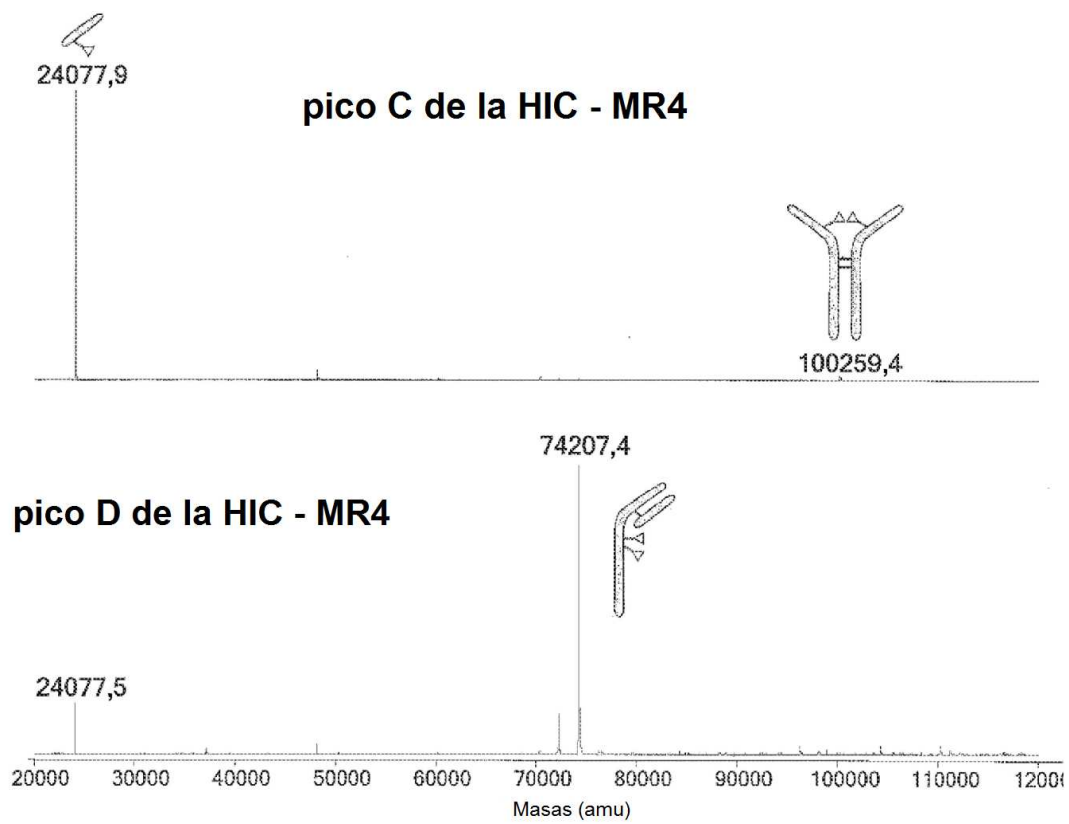


FIGURA 10

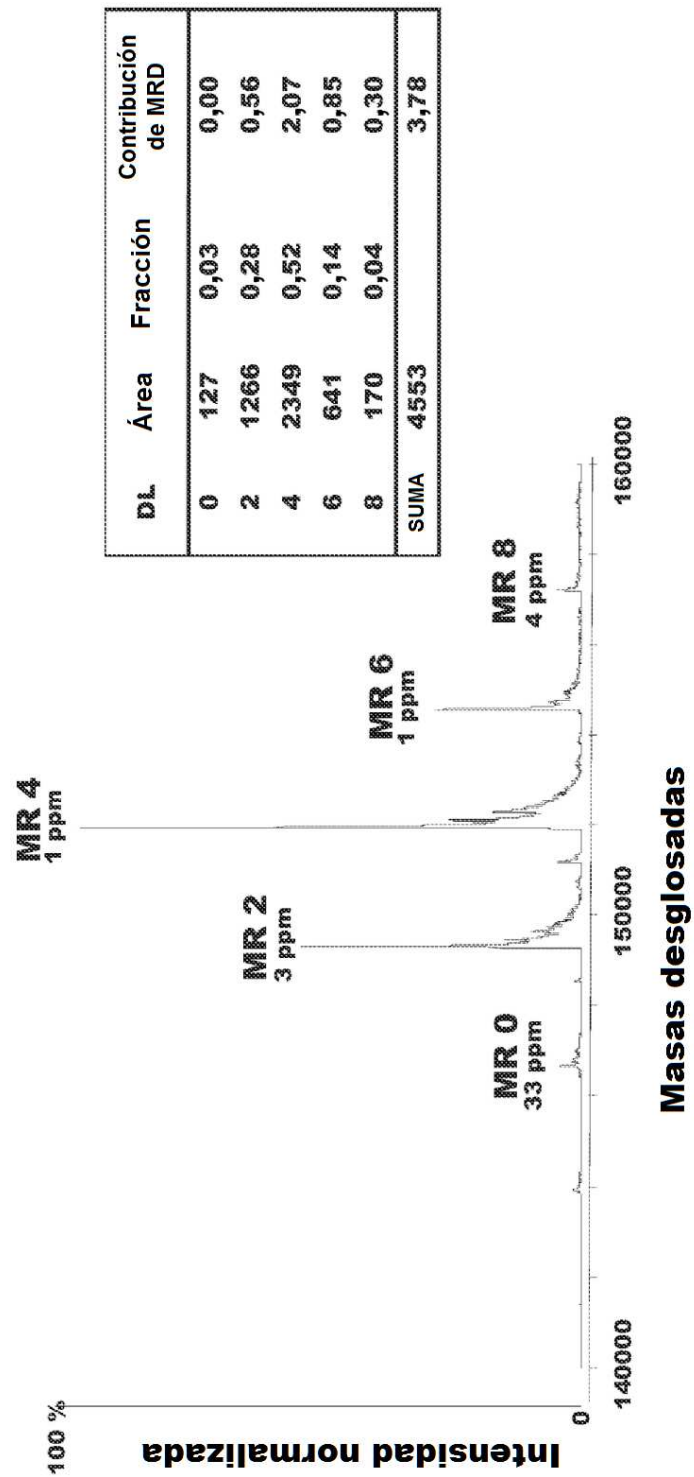


Figura 11

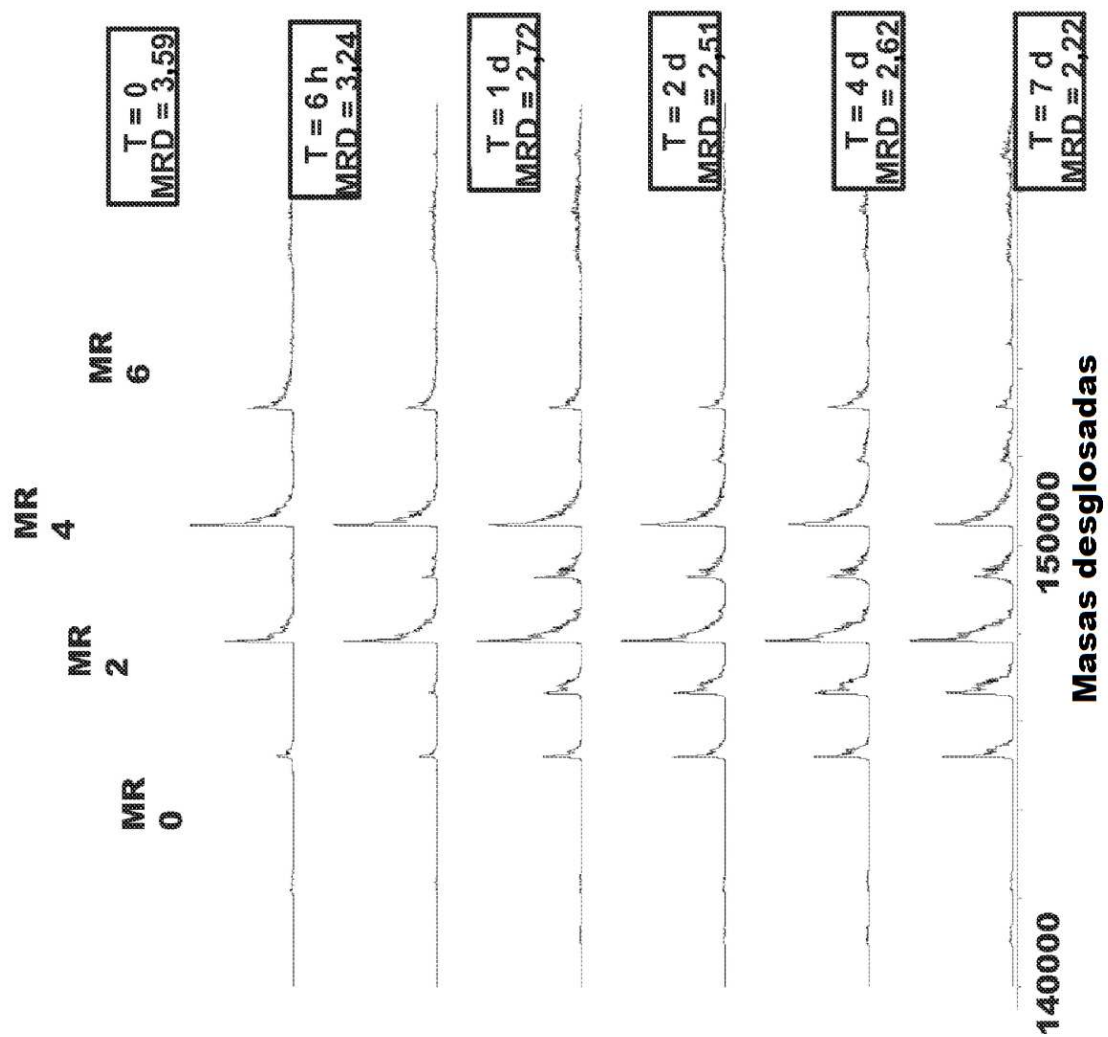


Figura 12