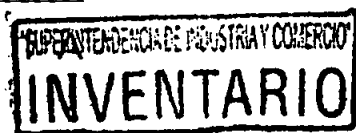




# Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial

Organizacion CSA Ltda

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

## PATENTE DE INVENCION

08-7864

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO " METODOS PARA DETERMINAR LAS FARMACOCINETICAS  
DE TERAPIAS DIRIGIDAS "

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL 601N 33/513, 601N 21/55

71. SOLICITANTE WYETH.

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA.

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDÓÑEZ  
TP. 20281.

22. BOGOTÁ, D. C., 28 DE ENERO DE 2008.

# PETITORIO



Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-007864- -00000-0000

Fecha: 2008-01-28 16:14:15 Dep. 2020 NUECREACION  
Tra. 11 PATENTE I/II Eve. 378 FASE NACIONAL  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 134

ción

## FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒ X

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE

(71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, Nueva Jersey 07940, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE  
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500

Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒ X

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.366 Usaquén

TP 28281

④

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: DAMLE, Nitin K.; KHANDKE, Kiran y BOGHAERT, Erwin R.

Dirección: 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458, Estados Unidos de América; 120 E. Allison Avenue, Nanuet, NY 10954, Estados Unidos de América y 93 Ludlam Road, Monroe, NY 10950, Estados Unidos de América, respectivamente

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense, Estadounidense y Belga, respectivamente.

⑤

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/025736

Fecha 30-JUN-2006

Publicación Internacional No. WO/2007/005690

Fecha 11-ENE-2007

⑥

Título (54)

METODOS PARA DETERMINAR LAS FARMACOCINETICAS DE TERAPIAS DIRIGIDAS

⑦

Clasificación Internacional (51)

G01N 33/543, G01N 21/55

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI

☒ X

NO

☐

US

01-JUL-2005

60/695,419

⑨

Comprobante de pago No. 08 - 4,652

Fecha 18-ENE-08

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

ANEXOS

2

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos, Reporte de búsqueda y opinión escrita, Notificación de presentación de documento de prioridad y Notificación de cambio.

11 FIGURA CARATERISTICA

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDONEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

2008 / 002

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 4,652  
 FECHA : ENERO 18 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-007864- -00000-0000

Fecha: 2008-01-28 16:14:15 Dep. 2020 NUECREACIONE  
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 134

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| JSITANTE         | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|---------------|
| BAKER & MCKENZIE | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 2930863  | 18/01/2008 | 45,361,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                          | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|-----------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 | SOLICITUDES                       |                |
| 1     |             | TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 501,000.00     |
|       |             | TOTAL :                           | \$ 501,000.00  |

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
11 January 2007 (11.01.2007)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2007/005690 A1**

(51) International Patent Classification:  
G01N 33/543 (2006.01) G01N 21/55 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/US2006/025736

(22) International Filing Date: 30 June 2006 (30.06.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/695,419 1 July 2005 (01.07.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH  
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DAMLE, Nitkin,  
K. [US/US]; 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ  
07458 (US). KHANDKE, Kiran [US/US]; 120 E. Allison  
Avenue, Nanuet, NY 10954 (US). BOGHAERT, Erwin,  
R. [BE/US]; 93 Ludlam Road, Monroe, NY 10950 (US).

(74) Agents: MEIGS, Julie, Broadus et al.; PILLSBURY  
WINTHROP SHAW PITTMAN LLP, P.o. Box 10500,  
McLean, VA 22102 (US).

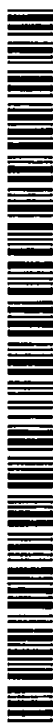
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,  
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



**WO 2007/005690 A1**

(54) Title: METHODS OF DETERMINING PHARMACOKINETICS OF TARGETED THERAPIES

(57) Abstract: The present invention relates to methods for determining pharmacokinetics of targeted therapies using mass-sensing techniques.

**METHODS OF DETERMINING PHARMACOKINETICS  
OF TARGETED THERAPIES  
RELATED APPLICATIONS**

Priority is claimed to U.S. Provisional Patent Application No. 60/695,419, filed on July 1, 2005, which is incorporated by reference in its entirety herein.

**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention generally relates to methods for determining pharmacokinetic properties of targeted therapies (e.g., immunoconjugates) using mass-sensing techniques.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

Synthetic and natural macromolecules have become established therapeutics in cancer treatment. Antibodies have proven clinical efficacy when administered as a naked or unconjugated antibody or as an antibody/drug conjugate. According to the latter approach, a therapeutic agent is coupled to an antibody with binding specificity for a defined target cell population. Therapeutic agents that have been conjugated to monoclonal antibodies include cytotoxins, biological response modifiers, enzymes (e.g., ribonucleases), apoptosis-inducing proteins and peptides, and radioisotopes.

Antibody-mediated drug delivery to tumor cells augments drug efficacy by minimizing its uptake in normal tissues. See e.g., Reff et al. (2002) *Cancer Control* 9:152-66; Sievers (2000) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46 Suppl:S18-22; Goldenberg (2001) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 39:195-201. MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicin) is a commercially available targeted immunotherapy that works according to this principle and which is approved for the treatment of acute myeloid leukemia in elderly patients. See Sievers et al. (1999) *Blood* 93: 3678-3684. In this case, the targeting molecule is an anti-CD33 monoclonal antibody that is conjugated to calicheamicin. Additional examples include ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN®) and tositumomab (BEXXAR®), which are radiolabeled anti-CD20 antibodies. See Dillman, *Clin. Exp. Med.*, 2006, 6(1):1-12.

Despite progress in developing new antibody-targeted therapies, the physiological characteristics conferring a favorable therapeutic index in the clinic are

not well understood. Simple biochemical assays (e.g., the affinity of antibody for its antigen) do not necessarily predict efficacy. See Graff & Wittrup, *Cancer Res.*, 2003, 63(6):1288-1296. Biological parameters *in vivo* such as circulation half-life, tissue distribution rates, and rate of conjugate degradation may be more helpful in comparing the potential therapeutic efficacy of these molecules. However, preclinical experiments designed to assess these parameters are difficult because they typically require large numbers of experimental animals and radiolabeling of the conjugate.

To address the need for methods of predicting clinical efficacy, the present invention provides plasmon resonance assays for pharmacokinetic characterization of targeted therapies following their administration to a subject. The assays disclosed herein accurately and reproducibly detect amounts of targeting molecule and targeting molecule/drug conjugate in a single, minimal volume sample. Based upon this determination, the circulation half-life of targeting molecule/drug conjugate, rates of conjugate degradation, and linker stability can be monitored in a subject.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods of determining an amount of targeting molecule and an amount of targeting molecule/drug conjugate in a sample. In a representative embodiment of the invention, the method comprises the steps of: (a) providing a solid support comprising a surface to which a target is immobilized; (b) providing a sample comprising a plurality of targeting molecule/drug conjugates; (c) contacting the sample with the target immobilized to the surface of the solid support; (d) detecting formation at the surface of the solid support of a first binding complex of (i) the targeting molecule and (ii) the target at the surface of the solid support, wherein formation of the first binding complex causes a first measurable change in mass property of the solid support indicating an amount of targeting molecule in the sample; (e) contacting the first binding complex with a drug binding agent that specifically binds the drug of the targeting molecule/drug conjugate; and (f) detecting formation at the surface of the solid support of a second binding complex of (i) the drug binding agent and (ii) the first binding complex, wherein formation of the second binding complex causes a second measurable change in mass property of the solid support indicating an amount of targeting molecule/drug conjugate in the sample.

Methods of determining an amount of targeting molecule/drug conjugate in a sample can also comprise the steps of: (a) providing a solid support comprising a surface to which a first binding complex is immobilized, wherein the binding complex comprises (i) a target and (ii) a targeting molecule/drug conjugate bound to the target; (b) contacting a drug binding agent that specifically binds the drug of the targeting molecule/drug conjugate with the first binding complex immobilized at the surface of the solid support; and (c) detecting formation of a second binding complex of (i) the drug binding agent and (ii) the first binding complex at the surface of the solid support, wherein formation of the complex causes a measurable change in mass property of the solid support indicating an amount of targeting molecule/drug conjugate in the sample.

In another aspect of the invention, methods of determining an average amount of drug loading per targeting molecule are provided. For example, a method of determining drug loading of targeting molecule/drug conjugates in a sample can comprise the steps of: (a) providing a solid support to which targeting molecule/drug conjugates of a sample are bound; (b) determining an amount of drug in the sample by measuring a change in mass property of a solid support upon binding of a drug binding agent, which specifically binds the drug of the targeting molecule/drug conjugate, to the targeting molecule/drug conjugates at the surface of the solid support; and (c) calculating an average amount of drug per targeting molecule/drug conjugate by dividing the amount of drug of (b) by an amount of targeting molecule in the sample.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows a sensorgram of a sandwich detection method. In the first phase of the curve (between arrow 1 and 2), the sample of antibody/calicheamicin conjugate was run over the immobilized antigen. A second phase (between arrow 3 and 4) was initiated by adding an anti-calicheamicin antibody. Response 1 indicates mass addition proportionate to the concentration of antibody in the sample, and response 2 is proportionate to the amount of calicheamicin in the antibody/calicheamicin conjugate. RU, resonance units; gray circles, washing period.

Figures 2A-2B show the correlation between the amount of antibody or antibody/drug conjugate and the concentration of standard samples. Figure 2A is a sensorgram showing resonance units as a function of time for each of the indicated

concentrations (ng/ml) of hP67.6-AcBut-CalichDMH. Figure 2B is a line graph showing resonance units as a function of concentration of hP67.6-AcBut-CalichDMH + anti-calicheamicin antibody (black filled circle), hP67.6-AcBut-CalichDMH (gray filled circle), and anti-calicheamicin antibody (open circle).

Figures 3A-3C show plasma concentrations of hP67.6-AcBut-CalichDMH determined using a sandwich detection method as described in Examples 3 and 4. Each animal received antibody/drug conjugate for a total dose of 3  $\mu$ g of calicheamicin. The dose of antibody/drug conjugate expressed in mg/kg is indicated. Solid lines, animals bearing CD22-positive Ramos tumors; dotted lines, tumor-free mice.

Figure 3A shows response 1, *i.e.*, binding of hP67.6 and hP67.6-AcBut-CalichDMH, to CD33 antigen immobilized on a CM5 chip.

Figure 3B shows response 2, *i.e.*, binding of anti-calicheamicin to hP67.6-AcBut-CalichDMH already bound to CD33 immobilized on a CM5 chip. The kinetics of hP67.6-AcBut-CalichDMH in plasma are similar in tumor-bearing and tumor-free animals.

Figure 3C shows the ratio of response 2 relative to response 1. The declining concentration of antibody/drug conjugate as a fraction of the concentration of the antibody moiety of the antibody/drug conjugate indicates the preferential clearance of conjugated versus unconjugated antibody.

Figure 4 is a line graph showing resonance units as a function of concentration of G5/44-AcBut-CalichDMH (inotuzumab ozogamicin) + anti-calicheamicin antibody (black filled circle), G5/44-AcBut-CalichDMH (gray filled circle), and anti-calicheamicin antibody (open circle).

Figures 5A-5C show plasma concentrations of G5/44-AcBut-CalichDMH determined using a sandwich detection method as described in Examples 3 and 5. G5/44 anti-CD22 antibody was loaded with 72  $\mu$ g calicheamicin per mg antibody, and each animal received antibody/drug conjugate for a total dose of 3  $\mu$ g of calicheamicin. Solid lines, animals bearing CD22-positive Ramos tumors; dotted lines, tumor-free mice.

Figure 5A shows response 1, *i.e.*, binding of G5/44 and G5/44-AcBut-CalichDMH to CD22 antigen immobilized on a CM5 chip.

Figure 5B shows response 2, *i.e.*, binding of anti-calicheamicin to G5/44-AcBut-CalichDMH already bound to CD22 immobilized on a CM5 chip. The presence of the CD22-positive Ramos tumor (solid lines) decreases the average concentration of G5/44 antibody and G5/44-AcBut-CalichDMH conjugates in plasma.

Figure 5C shows the ratio of response 2 relative to response 1. The declining concentration of antibody/drug conjugate as a fraction of the concentration of the antibody moiety of the antibody/drug conjugate indicates the preferential clearance of conjugated versus unconjugated antibody. Removal of calicheamicin from the antibody was not influenced by the presence of the CD22-positive Ramos tumor.

### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides methods of characterizing samples comprising compositions for targeted therapy, *i.e.*, a targeting molecule conjugated either directly or indirectly to a drug. Samples containing targeting molecule/drug conjugates may include some proportion of the constituent parts (*i.e.*, unconjugated targeting molecule and free drug), for example, as a result of incomplete conjugation, degradation of the conjugate, *etc.* In general, the unconjugated targeting molecule and free drug each have limited efficacy and may contribute to patient toxicity. Accordingly, for monitoring progress in patients receiving targeted therapies, drug loading and the concentration of targeting molecule/drug conjugate (rather than the constituent parts) is important. The disclosed methods provide for such determination, which can be used to assess pharmacokinetic parameters of a targeting molecule/drug conjugate, such as absorption, distribution, metabolism, and excretion, following administration to a subject.

As compared to prior methods, the present disclosure describes use of a mass-sensing technique to detect targeting molecule/drug conjugates, wherein such conjugates are labile. The concentration of targeting molecule/drug conjugates can be accurately determined in serum and/or at the targeting site to assess circulation half-life, linker stability, and an amount of drug that is delivered to the targeting site. A single, low-volume sample may be used to sequentially perform multiple detecting steps in a same sample, which enables calculation of drug loading on the targeting molecule/drug conjugate.

### I. Targeting Molecule/Drug Conjugates

Targeting molecules that may be used in the disclosed methods include any molecule that shows specific binding to a target. Specific binding refers to an affinity between two molecules which results in preferential binding in a heterogeneous sample. Binding is generally characterized by an affinity of at least about  $10^{-7}$  M or higher, such as at least about  $10^{-8}$  M or higher, or at least about  $10^{-9}$  M or higher, or at least about  $10^{-11}$  M or higher, or at least about  $10^{-12}$  M or higher.

Targeting molecules also include any molecule that, following administration to a subject, selectively binds to cells expressing the target. The term targeting refers to the preferential movement and/or accumulation *in vivo* of a molecule at a target site (e.g., cells or tissues) as compared to a control site. A target site comprises cells expressing a target, *i.e.*, an intended site for accumulation of the targeting molecule or targeting molecule/drug conjugate. A control site comprises cells that substantially lack expression of the target and which therefore substantially lack binding and/or accumulation of an administered targeting molecule or targeting molecule/drug conjugate. Selective binding generally refers to a preferential localization of a targeting molecule/drug conjugate such that an amount of targeting molecule at a target site is about 2-fold greater than an amount of targeting molecule at a control site, or about 5-fold greater, or about 10-fold greater or more.

Representative targeting molecules include antibodies, proteins, peptides, peptide mimetics, peptide nucleic acids (PNAs), oligonucleotides, ligands, lectins, and any other molecules that specifically and/or selectively bind to a target.

Targets bound by targeting molecules are generally associated with a disease state, a disease susceptible state, or a condition requiring treatment. Representative targets include antigens, haptens, proteins, peptides, receptors, oligonucleotides, carbohydrates, and any other molecules expressed at elevated levels by cells of a target site. A target is preferably present at the cellular surface or otherwise accessible to targeting molecules. A target site may be localized, such as in a solid tumor, or non-localized as in hematological malignancies. For example, a target site can comprise cells expressing tumor-associated antigens (TAA), antigens expressed on other malignant cells, immune cells contributing to inflammation, allergy, autoimmunity, *etc.*

In one aspect of the invention, the targeting molecule is an antibody and the invention relates to characterizing samples comprising immunoconjugates, *i.e.*,

antibody/drug conjugates. The antibody moiety of an antibody/drug conjugate can comprise any type of antibody, including for example, antibodies having tetrameric structure (e.g., similar to naturally occurring antibodies), or any other structure having at least one immunoglobulin light chain variable region or at least one immunoglobulin heavy chain region, or antigen-binding fragments thereof (e.g., Fab, modified Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> or Fv fragments). The disclosed methods may also be used to characterize conjugates prepared using chimeric antibodies, humanized antibodies, diabodies, single chain antibodies, tetravalent antibodies, and/or multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies).

For preparation of targeted anti-cancer therapies, tumor-associated antigens have been identified that specifically bind to cancer cells from solid tumors, such as squamous/adenomatous lung carcinoma (non-small-cell lung carcinoma), invasive breast carcinoma, colorectal carcinoma, gastric carcinoma, squamous cervical carcinoma, invasive endometrial adenocarcinoma, invasive pancreas carcinoma, ovarian carcinoma, squamous vesical carcinoma, and choriocarcinoma. Antigens for targeted therapy of hematologic malignancies may also be useful drug targets, for example, for the treatment of lymphomas and leukemias, such as including but not limited to low grade/follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL), small lymphocytic (SL) NHL, intermediate grade/ follicular NHL, intermediate grade diffuse NHL, high grade immunoblastic NHL, high grade lymphoblastic NHL, high grade small non-cleaved cell NHL, bulky disease NHL and Waldenstrom's Macroglobulinemia, chronic leukocytic leukemia, acute myelogenous leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, chronic myelogenous leukemia, lymphoblastic leukemia, lymphocytic leukemia, monocytic leukemia, myelogenous leukemia, and promyelocytic leukemia.

Representative antibodies that may be used to prepare antibody/drug conjugates for targeted therapy include anti-5T4 antibodies, anti-CD19 antibodies, anti-CD20 antibodies (e.g., RITUXAN®, ZEVALIN®, BEXXAR®), anti-CD22 antibodies, anti-CD33 antibodies (e.g., MYLOTARG®), anti-Lewis Y antibodies (e.g., Hu3S193, Mthu3S193, AGmthu3S193), anti-HER-2 antibodies (e.g., HERCEPTIN® (trastuzumab), MDX-210, OMNITARG® (pertuzumab, rhuMAb 2C4)), anti-CD52 antibodies (e.g., CAMPATH®), anti-EGFR antibodies (e.g., ERBITUX® (cetuximab), ABX-EGF (panitumumab)), anti-VEGF antibodies (e.g., AVASTIN® (bevacizumab)), anti-DNA/histone complex antibodies (e.g., ch-TNT-1/b), anti-CEA antibodies (e.g.,

CEA-Cide, YMB-1003), hLM609, anti-CD47 antibodies (e.g., 6H9), anti-VEGFR2 (or kinase insert domain-containing receptor, KDR) antibodies (e.g., IMC-1C11), anti-Ep-CAM antibodies (e.g., ING-1), anti-FAP antibodies (e.g., sibrotuzumab), anti-DR4 antibodies (e.g., TRAIL-R), anti-progesterone receptor antibodies (e.g., 2C5), anti-CA19.9 antibodies (e.g., GIVAREX®), and anti-fibrin antibodies (e.g., MH-1).

As used herein, a drug refers to any substance having biological or detectable activity, for example, therapeutic agents, binding agents, etc., as well as prodrugs, which are metabolized to an active agent *in vivo*. The term drug also includes drug derivatives, wherein a drug has been functionalized to enable conjugation with a targeting molecule.

The drug may be bound to the targeting molecule either directly or indirectly, but the linkage is such that it is compatible with preserving the therapeutic effect of the drug moiety. The linker may be stable or hydrolyzable, and any suitable technique for linking the drug to the antibody may be used. For example, hydrazides and other nucleophiles may be conjugated to the aldehydes generated by oxidation of the carbohydrates that naturally occur on antibodies. Hydrazone-containing conjugates can be made with introduced carbonyl groups that provide the desired drug-release properties. Conjugates can also be made with a linker that has a disulfide at one end, an alkyl chain in the middle, and a hydrazine derivative at the other end. Other representative linkers are thiol-reactive linkers such as esters, amides, and acetals/ketals, and pH sensitive linkers, such as cis-aconitates, which have a carboxylic acid juxtaposed to an amide bond. Linkers may also include solubilizing agents such as PEG to limit aggregation of the targeting molecule/drug conjugates. Peptide linkers may also be used.

Representative drugs include anti-cancer agents, such as cytotoxic agents, chemotherapeutic agents, immunomodulatory agents, anti-angiogenic agents, anti-proliferative agents, pro-apoptotic agents, enzymes, and bioactive proteins. A drug may also comprise a therapeutic nucleic acid, such as a gene encoding an immunomodulatory agent, an anti-angiogenic agent, an anti-proliferative agent, or a pro-apoptotic agent. These drug descriptors are not mutually exclusive, and thus a therapeutic agent may be described using one or more of the above-noted terms. Therapeutic agents may be prepared as pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. In addition, conjugates can be made using

WO 2007/005690

PCT/US2006/025736

secondary carriers as the cytotoxic agent, such as liposomes or polymers, for example.

The term cytotoxic agent generally refers to an agent that inhibits or prevents the function of cells and/or results in destruction of cells. Representative cytotoxic agents include antibiotics, inhibitors of tubulin polymerization, alkylating agents that bind to and disrupt DNA, and agents that disrupt protein synthesis or the function of essential cellular proteins such as protein kinases, phosphatases, topoisomerases, enzymes, and cyclins. For example, cytotoxic agents include, but are not limited to, doxorubicin, daunorubicin, idarubicin, aclarubicin, zorubicin, mitoxantrone, epirubicin, carubicin, nogalamycin, menogaril, pitarubicin, valrubicin, cytarabine, gemcitabine, trifluridine, ancitabine, enocitabine, azacitidine, doxifluridine, pentostatin, broxuridine, capecitabine, cladribine, decitabine, floxuridine, fludarabine, gougierotin, puromycin, tegafur, tiazofurin, adriamycin, cisplatin, carboplatin, cyclophosphamide, dacarbazine, vinblastine, vincristine, mitoxantrone, bleomycin, mechlorethamine, prednisone, procarbazine, methotrexate, flurouracils, etoposide, taxol, taxol analogs, platins such as cis-platin and carbo-platin, mitomycin, thiotepa, taxanes, vincristine, daunorubicin, epirubicin, actinomycin, anthramycin, azaserines, bleomycins, tamoxifen, idarubicin, dolastatins/auristatins, hemiasterlins, esperamicins and maytansinoids.

In particular aspects of the invention, the targeting molecule/drug conjugates characterized using the disclosed methods comprise an antibiotic drug moiety such as a calicheamicin, also called the LL-E33288 complex, for example, gamma-calicheamicin or a less potent derivative, N-acetyl gamma calicheamicin. See U.S. Patent No. 4,970,198. Additional examples of calicheamicins suitable for use in targeting molecule/drug candidates are disclosed in U.S. Patent Nos. 4,671,958; 5,053,394; 5,037,651; 5,079,233; and 5,108,912; which are each incorporated herein in their entirety. Disulfide analogs of calicheamicin can also be used, for example, analogs described in U.S. Patent Nos. 5,606,040 and 5,770,710, which are each incorporated herein in their entirety. Representative techniques for preparation of antibody/calicheamicin conjugates as set forth in Example 1 are described in U.S. Patent Nos. 5,712,374; 5,714,586; 5,773,001; and 5,877,296; U.S. Publication Nos. 2004-0082764-A1 and 2006-0002942-A1; and PCT Publication No. WP 2005/089809; which are each incorporated herein in their entirety.

Immunomodulatory agents that may be used to prepare targeting molecule/drug conjugates include anti-hormones that block hormone action on tumors and immunosuppressive agents that suppress cytokine production, downregulate self-antigen expression, or mask MHC antigens. Representative anti-hormones include anti-estrogens including for example tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY 117018, onapnstone, and toremifene; and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and anti-adrenal agents. Representative immunosuppressive agents include 2-amino-6-aryl-5-substituted pyrimidines, azathioprine, cyclophosphamide, bromocryptine, danazol, dapsone, glutaraldehyde, anti-idiotypic antibodies for MHC antigens and MHC fragments, cyclosporin A, steroids such as glucocorticosteroids, cytokine or cytokine receptor antagonists (e.g., anti-interferon antibodies, anti-IL10 antibodies, anti-TNF $\alpha$  antibodies, anti-IL2 antibodies), streptokinase, TGF $\beta$ , rapamycin, T-cell receptor, T-cell receptor fragments, and T cell receptor antibodies.

Representative anti-angiogenic agents include inhibitors of blood vessel formation, for example, farnesyltransferase inhibitors, COX-2 inhibitors, VEGF inhibitors, bFGF inhibitors, steroid sulphatase inhibitors (e.g., 2-methoxyoestradiol bis-sulphamate (2-MeOE2bisMATE)), interleukin-24, thrombospondin, metallospodin proteins, class I interferons, interleukin 12, protamine, angiostatin, laminin, endostatin, and prolactin fragments.

Anti-proliferative agents and pro-apoptotic agents include activators of PPAR-gamma (e.g., cyclopentenone prostaglandins (cyPGs)), retinoids, triterpinoids (e.g., cycloartane, lupane, ursane, oleanane, friedelane, dammarane, cucurbitacin, and limonoid triterpenoids), inhibitors of EGF receptor (e.g., HER4), rapamycin, CALCITRIOL® (1,25-dihydroxycholecalciferol (vitamin D)), aromatase inhibitors (FEMARA® (letrozole)), telomerase inhibitors, iron chelators (e.g., 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (Triapine)), apoptin (viral protein 3 - VP3 from chicken anemia virus), inhibitors of Bcl-2 and Bcl-X(L), TNF-alpha, FAS ligand, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L), activators of TNF-alpha/FAS ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) signaling, and inhibitors of PI3K-Akt survival pathway signaling (e.g., UCN-01 and geldanamycin).

Representative chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziidines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramidate, triethylenethiophosphoramidate and trimethylolomelamine; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfarnide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomysins, actinomycin, anthramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicins, carabycin, carminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-EU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiothane, testolactone; anti-adrenal such as aminogluthethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophospharnide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; razoxane; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2, 2', 2' -trichlorotriethylamine; urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside (Ara-C); cyclophosphamide; thiotepa; taxoids, e.g. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology of Princeton, New Jersey) and doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer of Antony, France); chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum

analogues such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminoropterin; xeloda; ibandronate; CPT-11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; esperamicins; and capecitabine.

Additional therapeutic agents that may be conjugated to targeting molecules and characterized using the methods disclosed herein include photosensitizing agents (U.S. Patent Publication No. 2002/0197262 and U.S. Patent No. 5,952,329) for photodynamic therapy; magnetic particles for thermotherapy (U.S. Patent Publication No. 2003/0032995); binding agents, such as peptides, ligands, cell adhesion ligands, etc., and prodrugs such as phosphate-containing prodrugs, thiophosphate-containing prodrugs, sulfate containing prodrugs, peptide containing prodrugs,  $\beta$ -lactam-containing prodrugs, substituted phenoxyacetamide-containing prodrugs or substituted phenylacetamide-containing prodrugs, 5-fluorocytosine and other 5-fluorouridine prodrugs that may be converted to the more active cytotoxic free drug.

## II. Pharmacokinetics of Targeting Molecule/Drug Conjugates

The present invention provides methods of determining drug loading of a targeting molecule, for example, to determine whether the conjugation reaction achieved a level of drug loading which comprises an effective dose, *i.e.*, an amount of targeting molecule/drug conjugate sufficient to elicit a desired biological response, and to maintain batch-to-batch consistency of commercially manufactured targeting molecule/drug conjugates. To assess drug release or stability of targeting molecule/drug conjugates, drug loading may also be assessed following administration to a patient, for example, using a blood sample from the patient.

As disclosed herein, an amount of targeting molecule/drug conjugate may be calculated from the separate determinations of (i) an amount of targeting molecule and (ii) an amount of targeting molecule/drug conjugate in the same sample. Steps (i) and (ii) are described herein below more fully under subheadings II.A and II.B, respectively. See also Figure 1. Briefly, the method includes measurement of two consecutive responses. A first response determines the number of resonance units after contacting a sample that contains the targeting molecule/drug conjugates over

a mass sensing device, such as a BIACORE® chip, with immobilized target recognized by the targeting molecule of the conjugate. This response is proportional to the sum of the free (unconjugated) and conjugated targeting molecule in the sample. A second response is obtained after sequentially contacting a drug binding agent with the conjugated and unconjugated targeting molecules bound to the immobilized target on the same mass sensing device. This second response is proportional to the amount of drug present as targeting molecule/drug conjugates in the sample.

In accordance with the disclosed methods, any suitable mass-sensing technique may be used. Representative techniques known in the art include piezoelectric, optical, thermo-optical, surface acoustic wave (SAW) methods, as well as electrochemical methods, such as potentiometric, voltametric, conductometric, amperometric and capacitance methods.

Optical methods that may be used include methods for detecting mass surface concentration (or refractive index), such as reflection-optical methods, including both internal and external reflection methods, *e.g.*, ellipsometry and evanescent wave spectroscopy (EWS), the latter including surface plasmon resonance (SPR), Brewster angle refractometry, critical angle refractometry, frustrated total reflection (FTR), evanescent wave ellipsometry, scattered total internal reflection (STIR), optical wave guide sensors, evanescent wave based imaging, such as critical angle resolved imaging, Brewster angle resolved imaging, SPR angle resolved imaging, *etc.*, as well as methods based on evanescent fluorescence (TIRF) and phosphorescence.

For example, to estimate the equilibrium constant of a targeting molecule in a sample, the following mass-sensing technique may be used. First, a concentration series (*e.g.*, 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, and 1000 ng/ml) of the targeting molecule is prepared and sequentially injected into a biosensor having a sensor chip operatively associated therewith, wherein the sensor chip has a reference sensing surface and at least one sensing surface with immobilized target. The relative responses at steady-state binding levels for each targeting molecule concentration are measured. Because of bulk-refractive index contributions from solvent additives in the biosensor's running buffer, a correction factor may be calculated (via known calibration procedures) and applied to give corrected relative responses. The corrected relative responses for each targeting molecule

concentration are then mathematically evaluated as is appreciated by those skilled in the art to estimate the equilibrium constant of the targeting molecule.

In a particular aspect of the invention, the mass sensing technique is surface plasmon resonance, which may be performed using a BIACORE® instrument (Biacore AB of Uppsala, Sweden). The apparatus and theoretical background are described in Jonsson et al., *BioTechniques*, 1991, 11:620-627. This technique involves immobilizing a first binding partner of a binding pair to a sensor chip, contacting the sensor chip with a sample containing a second binding partner of the binding pair, and then measuring a resultant change in the surface optical characteristics of the sensor chip.

In general, a solid support comprises a hydrogel matrix coating coupled to the top surface of the solid support, wherein the hydrogel matrix coating has a plurality of functional groups. For use with a BIACORE® instrument, the solid support is preferably in the form a sensor chip, wherein the sensor chip has a free electron metal interposed between the hydrogel matrix and the top surface. Suitable free electron metals for this purpose include copper, silver, aluminum and gold.

In a particular aspect of the invention, the method may comprise the steps of: (a) providing a solid support comprising a surface to which a target is immobilized; (b) providing a sample comprising a plurality of targeting molecule/drug conjugates; (c) contacting the sample with the target immobilized to the surface of the solid support; (d) detecting formation at the surface of the solid support of a first binding complex of (i) the targeting molecule and (ii) the target at the surface of the solid support, wherein formation of the first binding complex causes a first measurable change in mass property of the solid support indicating an amount of targeting molecule in the sample; (e) contacting the first binding complex with an anti-drug antibody or drug-binding fragment thereof; and (f) detecting formation at the surface of the solid support of a second binding complex of (i) the anti-drug antibody or drug-binding fragment thereof and (ii) the first binding complex, wherein formation of the second binding complex causes a second measurable change in mass property of the solid support indicating an amount of targeting molecule/drug conjugate in the sample.

In another aspect of the invention, a method of determining an average amount of drug loading per antibody in a sample of targeting molecule/drug conjugates can comprise the steps of: (a) providing a solid support to which targeting

molecule/drug conjugates of a sample are bound; (b) determining an amount of drug in the sample by measuring a change in mass property of a solid support upon binding of an anti-drug antibody or drug-binding fragment thereof to the targeting molecule/drug conjugates at the surface of the solid support; and (c) calculating an average amount of drug per targeting molecule/drug conjugate by dividing the amount of drug of (b) by an amount of targeting molecule in the sample. When considered as a function of time following administration to a subject, this method is useful for assessing circulation half-life of a targeting molecule/drug conjugate and linker stability.

Using the disclosed methods, targeting molecule/drug conjugates were detected in serum samples at a level of 100 to 1,000 ng/ml targeting molecule. As described in Examples 4 and 5, PK values of targeting molecule/drug conjugates were reproducibly determined in individual samples. The presence of a tumor expressing a target reduced the circulation half-life of a targeting molecule/drug conjugate with specificity for the target, but had no effect on the circulation half-life of a targeting molecule/drug conjugate having different specificity. *Compare* Figures 5B and 3B, respectively. The reduction of circulation half-life may be attributable to retention of the targeting molecule/drug conjugate in the presence of an appropriate target.

IIA. Methods of Determining an Amount of Targeting Molecule in a Sample Comprising Targeting Molecule /Drug Conjugates

The present invention provides methods of determining an amount of targeting molecule in a sample comprising a plurality of targeting molecule/drug conjugates. In a particular aspect of the invention, the method comprises the steps of (a) providing a solid support comprising a surface to which a target is immobilized; (b) providing a sample comprising a plurality of targeting molecule/drug conjugates; (c) contacting the sample with the target immobilized to the surface of the solid support; and (d) detecting formation of a binding complex of (i) targeting molecules in the sample and (ii) the target at the surface of the solid support, wherein formation of the binding complex causes a measurable change in mass property of the solid support.

Representative samples that may be used in accordance with the disclosed methods include targeting molecule/drug conjugate preparations, *i.e.*, a sample comprising a conjugation reaction between a targeting molecule and a drug, which

may include conjugated targeting molecule, unconjugated targeting molecule, and free drug. Samples obtained from a subject following administration of antibodies to the subject may also be used, for example, blood, serum, or urine samples. The sample can comprise a minimal liquid volume, such as a sample less than about 100  $\mu\text{l}$ , or less than about 50  $\mu\text{l}$ , or less than about 25  $\mu\text{l}$ , or less than about 10  $\mu\text{l}$ , or less than about 5  $\mu\text{l}$ . Larger sample volumes may be used to increase sensitivity. A sample may also comprise a liquid extract prepared from a tissue sample, such as a tumor. For example, a sample may be prepared from a squamous/adenomatous lung carcinoma (non-small-cell lung carcinoma), invasive breast carcinoma, colorectal carcinoma, gastric carcinoma, squamous cervical carcinoma, invasive endometrial adenocarcinoma, invasive pancreas carcinoma, ovarian carcinoma, squamous vesical carcinoma, choriocarcinoma, or other carcinomas of bronchi, breast, colon, rectum, stomach, cervix, endometrium, pancreas, ovaria, chorium, and seminal vesicles.

IIB. Methods of Determining an Amount of Drug in a Sample Comprising Targeting Molecule/Drug Conjugates

For determining an amount of drug in a sample, targeting molecule/drug conjugates are bound to a mass-sensing chip, and a drug binding agent that specifically binds to the drug moiety of the targeting molecule/drug conjugate is used to detect the conjugates. A drug binding agent can comprise an anti-drug antibody, or drug-binding fragment thereof. Additional representative binding agents include proteins, peptides, peptide mimetics, peptide nucleic acids (PNAs), ligands, or any other molecule that specifically binds to a drug moiety as described herein.

For example, the method may comprise the steps of (a) providing a solid support comprising a surface to which a first binding complex is immobilized, wherein the binding complex comprises (i) a target as described herein and (ii) a targeting molecule/drug conjugate bound to the target; (b) contacting an anti-drug antibody or drug-binding fragment thereof with the first binding complex immobilized at the surface of the solid support; and (c) detecting formation of a second binding complex of (i) the anti-drug antibody or drug-binding fragment thereof and (ii) the first binding complex at the surface of the solid support, wherein formation of the complex causes a measurable change in mass property of the solid support indicating an amount of targeting molecule/drug conjugate in the sample.

Alternatively, the method may comprise the steps of (a) providing a solid support comprising a surface to which an anti-drug antibody or drug-binding fragment thereof is immobilized; (b) contacting a sample comprising targeting molecule/drug conjugates with the anti-drug antibody or drug-binding fragment immobilized at the surface of the solid support; and (c) detecting a measurable change in mass property of the solid support indicating an amount of targeting molecule/drug conjugate in the sample.

An antibody that is used to detect the drug moiety of the targeting molecule/drug conjugate may be any antibody that shows specific binding, *i.e.*, preferential binding to the drug when the drug is presented in a sample containing other antigens. The antibody may be polyclonal or monoclonal. Anti-drug antibodies having low off rates provide the greatest sensitivity. When using anti-drug antibodies having moderate off-rates, background corrections may be used to quantify targeting molecule/drug conjugates at reduced sensitivity.

Methods for preparing and characterizing anti-drug antibodies are well known in the art. See, *e.g.*, Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Additional techniques and reagents useful for generating and screening an antibody display library can be found in, for example, U.S. Patent No. 5,223,409 and PCT International Application Publication Nos. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690, and WO 90/02809.

Briefly, a polyclonal antibody is prepared by immunizing an animal with an immunogen comprising a drug as described herein, and collecting antisera from that immunized animal. A wide range of animal species can be used for the production of antisera, for example rabbits, mice, rats, hamsters, guinea pigs, goats, and donkeys.

As is well known in the art, the immunogen may be coupled with a carrier, such as keyhole limpet hemocyanin (KLH) and serum albumins (*e.g.*, BSA), to improve immunogenicity. Techniques for conjugating an immunogen to a carrier polypeptide are well known in the art and include glutaraldehyde, *m*-maleimidobencoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester, carbodiimide and bis-biazotized benzidine. Immunogenicity of an immunogen can also be enhanced by the use of adjuvants, for example, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvants, and aluminum hydroxide adjuvant.

22

The amount of immunogen used for the production of polyclonal antibodies varies upon the nature of the immunogen, the animal used for immunization, and the administration route (e.g., subcutaneous, intramuscular, intradermal, intravenous, or intraperitoneal). The production of polyclonal antibodies is monitored by sampling blood of the immunized animal at various points following immunization. When a desired titer of antibody is obtained, the immunized animal is bled and the serum isolated and stored.

An anti-drug monoclonal antibody for use in the disclosed methods can be readily prepared through use of well-known techniques such as those exemplified in U.S. Pat. No. 4,196,265. For example, mice or rats are immunized with a drug for a sufficient period to obtain an immune response, and then spleen cells from the immunized animal are then fused with immortal myeloma cells. Fused cells are separated from the mixture of non-fused parental cells, for example, by the addition of agents to the culture media that block *de novo* nucleotide synthesis (e.g., aminopterin, methotrexate, and azaserine). Individual hybridomas are cultured and supernatants are tested for reactivity with the drug immunogen. The selected clones can be propagated indefinitely as a source of the monoclonal antibody.

By way of specific example, to produce an anti-drug antibody as described herein, mice are injected intraperitoneally with between about 1-200  $\mu$ g of an antigen comprising a drug of a targeting molecule/drug conjugate. B lymphocyte cells are stimulated to grow by injecting the drug in association with an adjuvant such as complete Freund's adjuvant. As needed, mice are boosted by injection with a second dose of the drug mixed with incomplete Freund's adjuvant. A few weeks after the second injection, mice are tail bled and the sera titered by immunoprecipitation. The steps of boosting and titering are repeated until a suitable titer is achieved. The spleen of the mouse is removed, spleen lymphocytes are isolated, and myeloma cells are combined with the spleen lymphocytes under conditions appropriate for cell fusion. Fusion conditions include, for example, the presence of polyethylene glycol. Fused cells are separated from unfused myeloma cells by culturing in a selection medium such as HAT media (hypoxanthine, aminopterin, thymidine). The resultant hybridomas are screened for the production of anti-drug antibodies. Selected clones are cultured in high volumes to achieve

suitable amounts of antibody. The antibodies may be purified by affinity chromatography or other methods, as is known in the art.

### EXAMPLES

The following examples have been included to illustrate modes of the invention. Certain aspects of the following examples are described in terms of techniques and procedures found or contemplated by the present co-inventors to work well in the practice of the invention. These examples illustrate standard laboratory practices of the co-inventors. In light of the present disclosure and the general level of skill in the art, those of skill will appreciate that the following examples are intended to be exemplary only and that numerous changes, modifications, and alterations may be employed without departing from the scope of the invention.

#### EXAMPLE 1

##### Preparation of Antibody/Calicheamicin Conjugates

Gemtuzumab ozogamicin and inotuzumab ozogamicin are calicheamicin conjugates of the anti-CD33 and anti-CD22 antibodies, hP67.6 and G5/44, respectively. Gemtuzumab ozogamicin is the generic name for the marketed drug MYLOTARG® and is also referred to as hP67.6-AcBut-CalichDMH. The anti-CD22/calicheamicin conjugate, inotuzomab ozogamicin, also known as G5/44-AcBut-CalichDMH, is currently in phase I clinical trials. To obtain these conjugates, hP67.6 and G5/44 were linked to N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide with the acid labile (4-(4' acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut) linker. Antibodies were loaded at a density of approximately 35 µg calicheamicin per mg hP67.6 and approximately 73 µg calicheamicin per mg G5/44. Anti-Lewis Y/calicheamicin and anti-5T4/calicheamicin conjugates were similarly prepared and used in the disclosed assays.

#### EXAMPLE 2

##### Administration of Antibody/Calicheamicin Conjugates

The Ramos cell line (CRL-1923) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Ramos is a CD22<sup>+</sup>, CD33<sup>-</sup> cell line derived from a human B-cell lymphoma. The cells were maintained in suspension cultures in RPMI1640 supplemented with 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 0.2 % (w/v) glucose, 100

U/ml penicillin G sodium, 100 µg/ml streptomycin sulphate and 10 % (v/v) fetal bovine serum.

Balb/c nude mice of 16 weeks old (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts) were irradiated with 400 rad gamma rays. Ramos cells ( $10^7/200\ \mu\text{l}$ ) were injected in the right flank of each mouse. After 8 days, 10 mice with a tumor size of approximately  $0.5\ \text{cm}^3$  ( $\pm s=0.16$ ) were selected. Four treatment groups were created: (1) tumor-bearing mice treated with hP67.6-AcBut-CalichDMH, (2) tumor-free mice treated with hP67.6-AcBut-CalichDMH, (3) tumor-bearing mice treated with G5/44-AcBut-CalichDMH, and (4) tumor-free mice treated with G5/44-AcBut-CalichDMH. Two days prior to administration of antibody/calicheamicin conjugates, a 5 µl blood sample was taken from each mouse. A single dose of 150 µl antibody/calicheamicin conjugate (3 µg calicheamicin per mouse) was injected into the lateral tail vein. Blood samples of exactly 5 µl were taken at 24, 48, 72, and 96 hours thereafter. To obtain reproducible small volume samples, the mice were kept under a heating lamp until tail veins became visible. The tail was disinfected with 70% isopropyl alcohol, and the lateral tail vein was ruptured with a needle. The resultant blood droplet was then aspirated with a capillary mounted to a micropipettor (Drummond of Broomall, Pennsylvania) preset to an aspiration volume of 5 µl. This blood sample was immediately transferred to a test tube containing 195 µl of the following mixture: 0.01 M HEPES (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 (HBS-EP buffer, available from Biacore of Uppsala, Sweden).

### EXAMPLE 3

#### Plasmon Resonance Sandwich Detection Assay

A plasmon resonance sandwich detection assay was developed to determine in a serum sample (1) an amount of targeting molecule and targeting molecule/drug conjugate in a sample, and (2) an amount of drug present in targeting molecule/drug conjugates of the same sample. The principle of this method is illustrated in Figure 1. The assay allows for an evaluation of the clearance of targeting molecule/drug conjugate. The method does not discriminate between a reduction of drug on all the conjugate molecules and the generation of a fraction of unconjugated antibody.

The analyses described herein were performed on a BIACORE® instrument (Biacore International AB of Uppsala, Sweden) using antibody/calicheamicin conjugates. The detection system of this instrument relies upon the measurement

of refractive index changes caused by the interaction of macromolecules on biosensor chips. See e.g., Johne et al., *J. Immunol. Methods*, 1993, 160(2):191-198; Karlson et al., *J. Immunol. Methods*, 1991, 145(1-2):229-240.

Antigens were immobilized to the surface of a CM5 biosensor chip at a density of 4000-9000 resonance units/flow cell. The chip was activated by the coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide-HCl/N-hydroxysuccinimide at a flow rate of 5  $\mu$ l/minute for 6 minutes, followed by addition of antigens. Lewis-BSA antigens were loaded by contacting the chip with 50  $\mu$ g/ml protein in a solution of 10 mM sodium acetate (pH 4.0-4.5) at a flow rate of 5  $\mu$ l/minute for 6 minutes. CD33 or CD22Fc were covalently linked to CM5 chips by contacting the chip to 0.1 mg/ml protein in a solution of 10 mM sodium acetate (pH 5) at a flow rate of 2  $\mu$ l per minute for 30 minutes. The chip was then washed with HBS-EP containing 300 mM NaCl.

Following immobilization of the antigen on a CM5 chip, calibration curves were established for each antigen. As a representative result, Figures 2A-2B show the correlation between the concentration of standard samples and the number of resonance units upon binding of the anti-CD33/calicheamicin conjugate hP67.6-AcBut-CalichDMH. A correlation coefficient of approximately 1.0 allows for accurate determination of the total amount of antibody and the amount of calicheamicin bound to antibody. Using the calibration curves, the serum concentration of the antibody moiety of an antibody/drug conjugate was determined.

By thereafter contacting the chip with an anti-calicheamicin antibody, the amount of calicheamicin present in the serum sample was also determined. As demonstrated by the absence of a second response in Figure 2B, unconjugated antibody at the same concentrations does not react to the anti-calicheamicin antibody. This result provides evidence for the specificity of the second response for the presence of calicheamicin on the antibody.

The response after binding of the conjugate to CD33 by itself (hP67.6-AcBut-CalichDMH) as well as followed by a secondary response (hP67.6-AcBut-CalichDMH + anti-calicheamicin) was linear ( $r^2=0.9996$  and  $r^2=0.9994$ , respectively) for a concentration range of conjugate between 0 and 500 ng/ml. The difference of these responses (i.e., resonance units attributable to binding of anti-calicheamicin) is also linear ( $r^2=0.9947$ ) within this range. The regression coefficients of the quadratic

equations of these functions were larger than 0.99 when a concentration range of 0 to 1000 ng/ml was used. Interpolation using a quadratic equation of resonance units plotted as a function of concentration allows for the accurate determination of antibody/drug conjugate concentration in a sample containing between 0 and 1000 ng/ml of antibody/drug conjugate.

A similar strategy was used to establish the calibration curves depicting (1) the relationship between resonance units and the concentration of G5/44 anti-CD22 antibody and G5/44-AcBut-CalichDMH (see Figure 4); and (2) the relationship between resonance units and the concentration of G193 anti-Lewis Y antibody and CMD193, a calicheamicin conjugate thereof. These relationships were also best described ( $r^2 > 0.99$ ) by a quadratic equation for a concentration range between 0 and 1000 ng/ml.

#### EXAMPLE 4

##### Pharmacokinetic Properties of Anti-CD33/Calicheamicin Conjugates

The pharmacokinetic properties of hP67.6-AcBut-CalichDMH were determined in tumor-bearing and tumor-free mice. Five animals were used for each group. Tumor-bearing mice had an average body weight of 19 g (standard deviation = 1 g) and had xenografted Ramos tumors with an average volume of 528 mm<sup>3</sup> (standard deviation 102 mm<sup>3</sup>). Tumor-free mice had an average body weight of 20 g (standard deviation = 1 g).

Figure 3A shows the concentration of hP67.6-AcBut-CalichDMH in plasma of nude mice at various time points following intravenous injection of a single dose of antibody/drug conjugate. A dose of 3 µg calicheamicin was administered to each mouse. The dose of antibody as µg/kg body mass is indicated. The concentration of the antibody/drug conjugate in plasma was calculated by correcting for a normal hematocrit of 45%, and it was assumed that no antibody/drug conjugate was bound to the cell fraction. A 3 µg calicheamicin dose, which is provided as 86 µg antibody/drug conjugate having 35 µg calicheamicin per mg antibody, is administered in a blood volume of 1.5 ml (approximate blood volume of a 20 g mouse). Therefore, one would theoretically anticipate 105 µg/ml as a maximum concentration. Based upon a blood sample volume of 5 µl, the experimentally determined concentration of antibody/drug conjugate after 20 minutes was approximately 80 µg/ml.

The amounts of antibody/drug conjugate that were administered to each mouse varied depending on the actual body mass of the animal. Within a range of 4.1 to 4.5 mg antibody/drug conjugate per kg, the administered dose was not directly proportional to the maximum concentration of the conjugate in plasma. In addition, the data did not indicate that dose variation was responsible for variations in circulation half-life. An exceptionally high circulation half-life was observed in a single mouse that received a dose of 5 mg antibody/drug conjugate per kg.

The amount of hP67.6 conjugated to calicheamicin has a shorter circulation half-life than the unconjugated antibody. This is illustrated in Figure 3C, which shows a consistently declining concentration of conjugated calicheamicin (response 2) as a fraction of the antibody-moiety of hP67.6-AcBut-CalichDMH (response 1). The reproducible reduction of total calicheamicin bound to antibody was not influenced by the presence of the CD22<sup>+</sup> Ramos tumor.

#### EXAMPLE 5

##### Pharmacokinetic Properties of Anti-CD22/Calicheamicin Conjugates

The pharmacokinetic properties of G5/44-AcBut-CalichDMH were determined in tumor-bearing and tumor-free mice. Three tumor-bearing mice had an average body weight of 19 g (standard deviation = 1 g) and had xenografted Ramos tumors with an average volume of 1276 mm<sup>3</sup> (standard deviation 398 mm<sup>3</sup>). Six tumor-free mice had an average body weight of 20 g (standard deviation = 1 g). Administration of anti-CD22/calicheamicin conjugates and surface plasmon resonance assay were performed as described in Examples 2, 3, and 4.

Calibration curves depicting the relationship between resonance units and the concentration of the G5/44 antibody and G5/44-AcBut-CalichDMH conjugate are shown in Figure 4. The relationship was best described ( $r > 0.99$ ) by a quadratic equation for a concentration range between 0 and 1000 ng/ml. See Figure 4. As for unconjugated hP67.6, a response to free calicheamicin was not observed with unconjugated G5/44.

Figure 5A shows the declining concentration of the antibody moiety of G5/44-AcBut-CalichDMH in plasma of tumor bearing and non-tumor bearing mice. Concentrations of the antibody moiety of G5/44-AcBut-CalichDMH (Figure 5A) and of the amount of calicheamicin bound to G5/44 (Figure 5B) declined faster in tumor-bearing mice. This was reflected in the decreased circulation half-life of G5/44-AcBut-CalichDMH. See Table I. The presence of a tumor that expresses the CD22

target enhanced the removal of the conjugate from plasma. The decline of the calicheamicin concentration as a function of time was identical in tumor bearing and non-tumor bearing mice (Figure 5C), indicating that the presence of the tumor did not influence the release of calicheamicin from the antibody moiety of the conjugate.

Table I

|    |                | - tumor         | + tumor         |
|----|----------------|-----------------|-----------------|
| AB | <sup>2</sup> T | 55 ± 18 *       | 39 ± 21         |
|    | AUC            | 2,251 ± 406     | 997 ± 241       |
|    | CL             | 0.0012 ± 0.0002 | 0.0025 ± 0.0007 |
|    | Vss            | 5 ± 2           | 7 ± 4           |
| CM | <sup>2</sup> T | 29 ± 5.8        | 22.4 ± 6.3      |
|    | AUC            | 1,236 ± 233     | 681 ± 164       |
|    | CL             | 0.002 ± 0.000   | 0.004 ± 0.001   |
|    | Vss            | 4.6 ± 1.2       | 5.2 ± 0.9       |

AB = antibody moiety, CM = calicheamicin bound to antibody, <sup>2</sup>T = plasma half-life (h), AUC = area under the curve (h\*µg/ml), CL = clearance (ml/min/kg), Vss = volume distribution (ml/kg)

CLAIMS

1. A method of determining an amount of targeting molecule and an amount of targeting molecule/drug conjugate in a sample comprising the steps of:

(a) providing a solid support comprising a surface to which a target is immobilized;

(b) providing a sample comprising a plurality of targeting molecule/drug conjugates;

(c) contacting the sample with the target immobilized to the surface of the solid support;

(d) detecting formation at the surface of the solid support of a first binding complex of (i) the targeting molecule and (ii) the target at the surface of the solid support, wherein formation of the first binding complex causes a first measurable change in mass property of the solid support indicating an amount of targeting molecule in the sample;

(e) contacting the first binding complex with a drug binding agent that specifically binds the drug of the targeting molecule/drug conjugate; and

(f) detecting formation at the surface of the solid support of a second binding complex of (i) the drug binding agent and (ii) the first binding complex, wherein formation of the second binding complex causes a second measurable change in mass property of the solid support indicating an amount of targeting molecule/drug conjugate in the sample.

2. The method of claim 1, wherein the target is expressed on cancer cells or on cells involved in an autoimmune response.

3. The method of claim 2, wherein the target expressed on cancer cells is 5T4, CD19, CD20, CD22, CD33, Lewis Y, HER-2, type I Fc receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RI), CD52, epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor (VEGF), DNA/histone complex, carcinoembryonic antigen (CEA), CD47, VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2 or kinase insert domain-containing receptor, KDR), epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), fibroblast activation protein (FAP), Trail receptor-1 (DR4), progesterone receptor, oncofetal antigen CA19.9, or fibrin.

4. The method of claim 1, wherein the targeting molecule is an antibody.

5. The method of claim 1, wherein the drug is calicheamicin.

6. The method of claim 1, wherein the drug binding agent is an antibody.

7. The method of claim 1, wherein the sample comprises a volume of about 5  $\mu$ l or less.
8. The method of claim 1, wherein the sample is a blood sample.
9. A method of determining an amount of targeting molecule/drug conjugate in a sample comprising the steps of:
  - (a) providing a solid support comprising a surface to which a first binding complex is immobilized, wherein the binding complex comprises (i) a target and (ii) a targeting molecule/drug conjugate bound to the target;
  - (b) contacting a drug binding agent that specifically binds the drug of the targeting molecule/drug conjugate with the first binding complex immobilized at the surface of the solid support; and
  - (c) detecting formation of a second binding complex of (i) the drug binding agent and (ii) the first binding complex at the surface of the solid support, wherein formation of the complex causes a measurable change in mass property of the solid support indicating an amount of targeting molecule/drug conjugate in the sample.
10. The method of claim 9, wherein the target is expressed on cancer cells or on cells involved in an autoimmune response.
11. The method of claim 9, wherein the target expressed on cancer cells is 5T4, CD19, CD20, CD22, CD33, Lewis Y, HER-2, type I Fc receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RI), CD52, epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor (VEGF), DNA/histone complex, carcinoembryonic antigen (CEA), CD47, VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2 or kinase insert domain-containing receptor, KDR), epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), fibroblast activation protein (FAP), Trail receptor-1 (DR4), progesterone receptor, oncofetal antigen CA19.9, or fibrin.
12. The method of claim 9, wherein the targeting molecule is an antibody.
13. The method of claim 9, wherein the drug is calicheamicin.
14. The method of claim 9, wherein the drug binding agent is an antibody.
15. The method of claim 9, wherein the sample comprises a volume of about 5  $\mu$ l or less.
16. The method of claim 9, wherein the sample is a blood sample.
17. The method of claim 9, wherein the amount of targeting molecule in the sample is determined by measuring a change in mass property of a solid support

upon binding of targeting molecule/drug conjugates to a target immobilized at a surface of a solid support.

18. A method of determining an average amount of drug loading per targeting molecule in a sample of targeting molecule/drug conjugates comprising the steps of:

(a) providing a solid support to which targeting molecule/drug conjugates of a sample are bound;

(b) determining an amount of drug in the sample by measuring a change in mass property of a solid support upon binding of a drug binding agent that specifically binds the drug of the targeting molecule/drug conjugate to the targeting molecule/drug conjugates at the surface of the solid support; and

(c) calculating an average amount of drug per targeting molecule/drug conjugate by dividing the amount of drug of (b) by an amount of targeting molecule in the sample.

19. The method of claim 18, wherein the target is expressed on cancer cells or on cells involved in an autoimmune response.

20. The method of claim 18, wherein the target expressed on cancer cells is 5T4, CD19, CD20, CD22, CD33, Lewis Y, HER-2, type I Fc receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RI), CD52, epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor (VEGF), DNA/histone complex, carcinoembryonic antigen (CEA), CD47, VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2 or kinase insert domain-containing receptor, KDR), epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), fibroblast activation protein (FAP), Trail receptor-1 (DR4), progesterone receptor, oncofetal antigen CA19.9, or fibrin.

21. The method of claim 18, wherein the targeting molecule is an antibody.

22. The method of claim 18, wherein the drug is calicheamicin.

23. The method of claim 18, wherein the drug binding agent is an antibody.

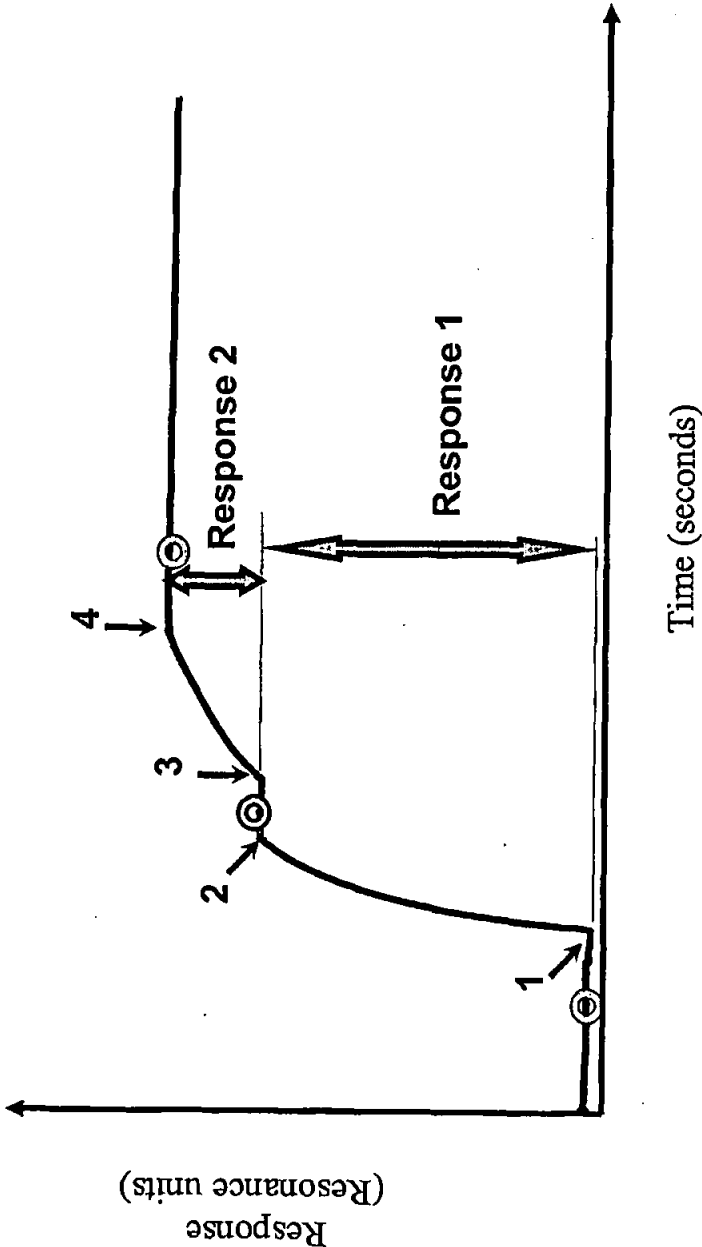
24. The method of claim 18, wherein the sample comprises a volume of about 5  $\mu$ l or less.

25. The method of claim 18, wherein the sample is a blood sample.

26. The method of claim 18, wherein the amount of targeting molecule in the sample is determined by measuring a change in mass property of a solid support

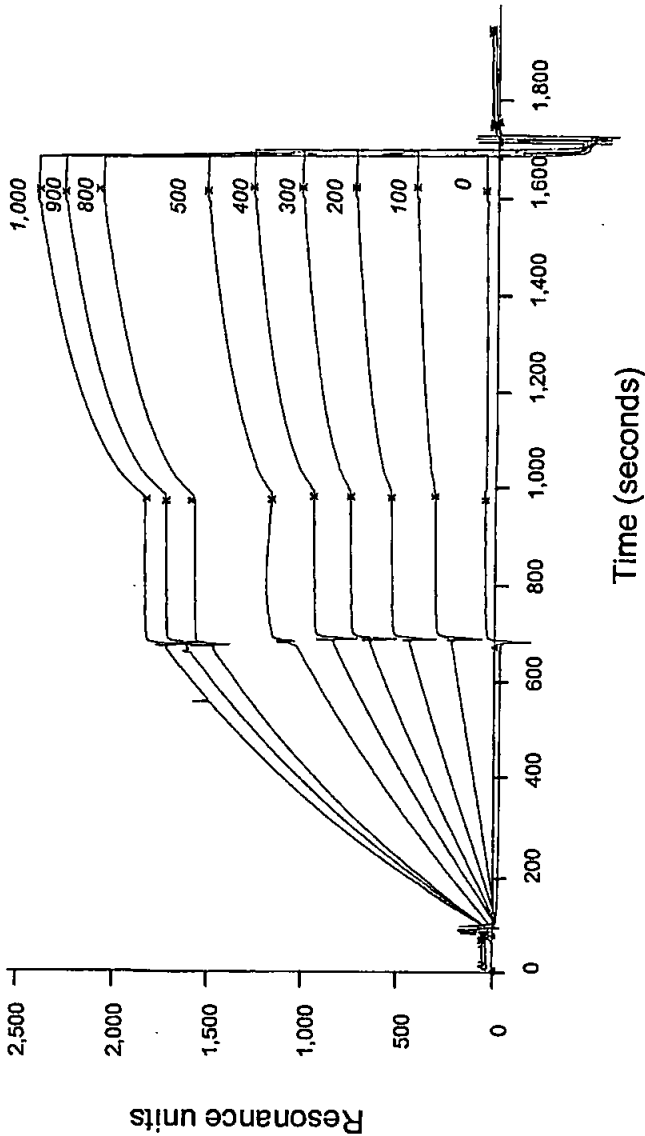
[1/10]

FIG. 1

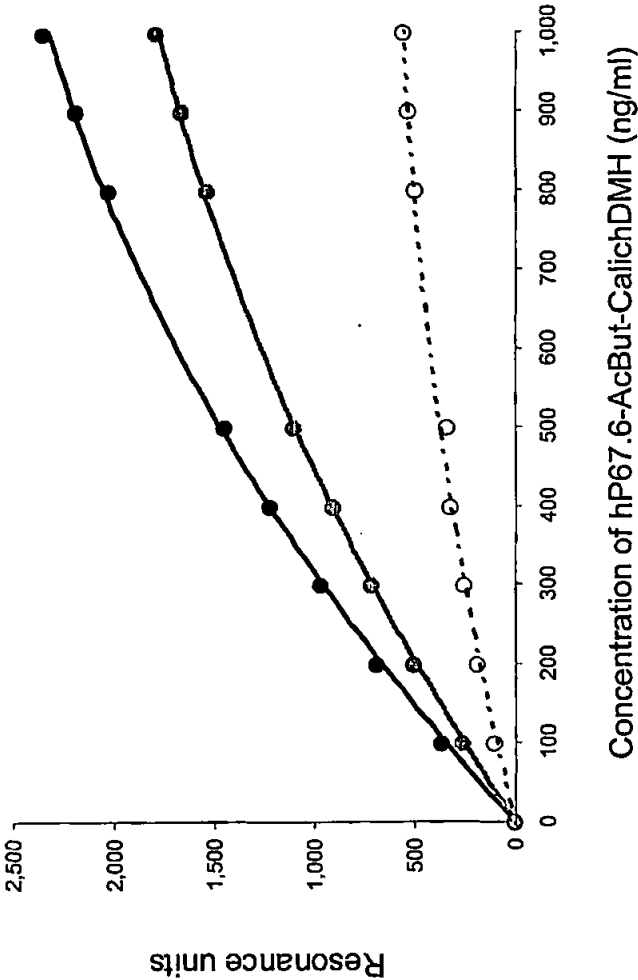


[2/10]

FIG. 2A

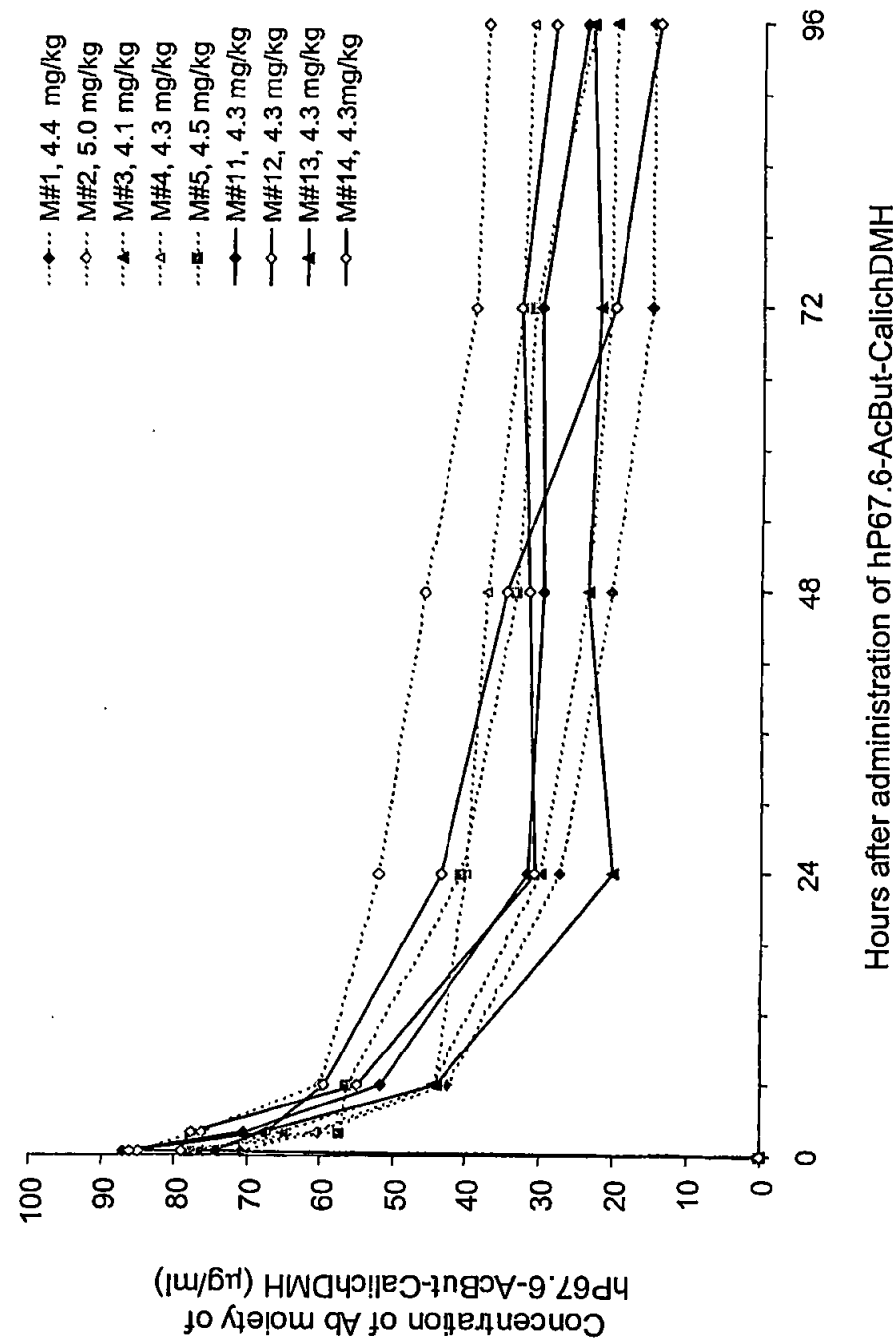


[3/10]  
FIG. 2B

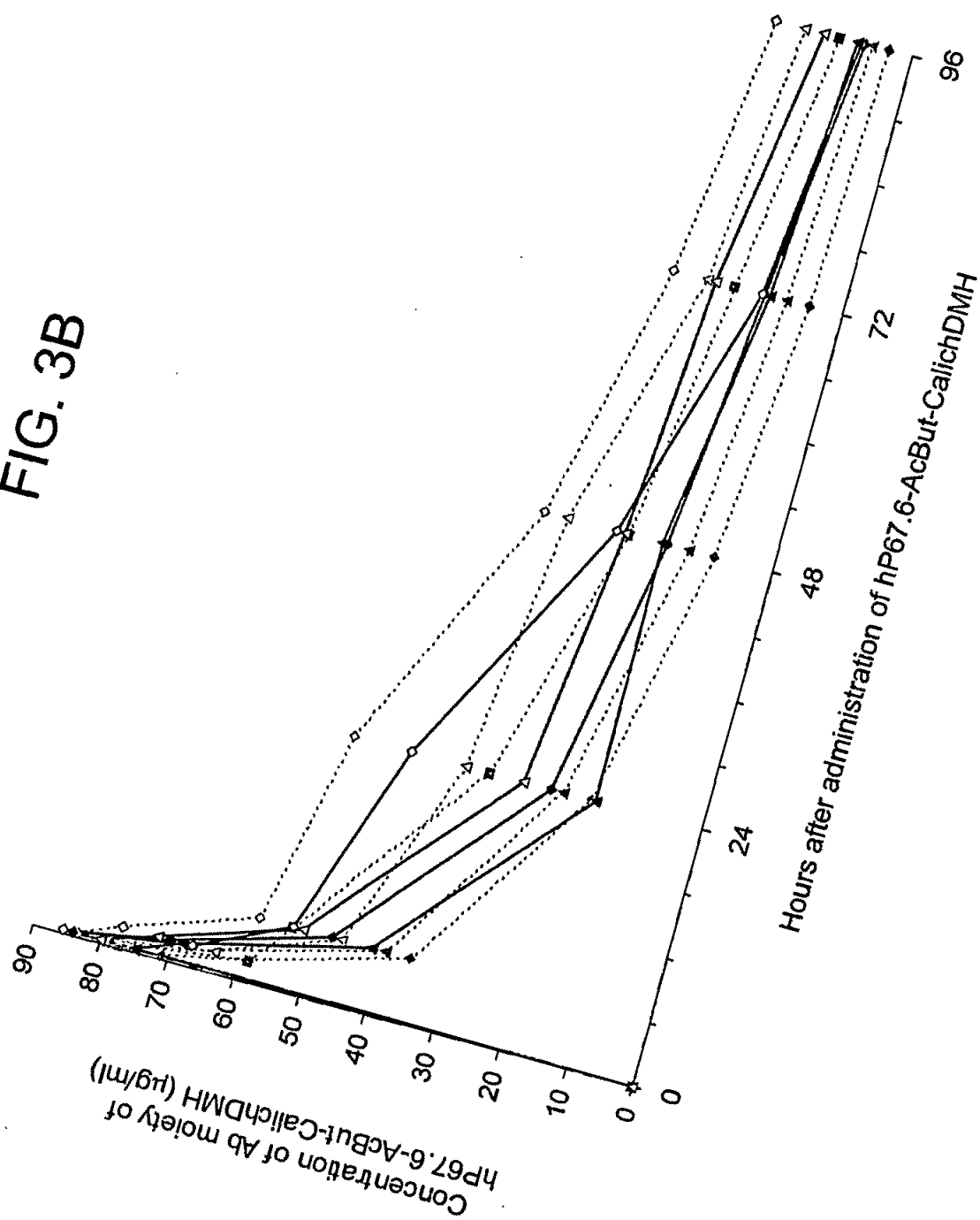


[4/10]

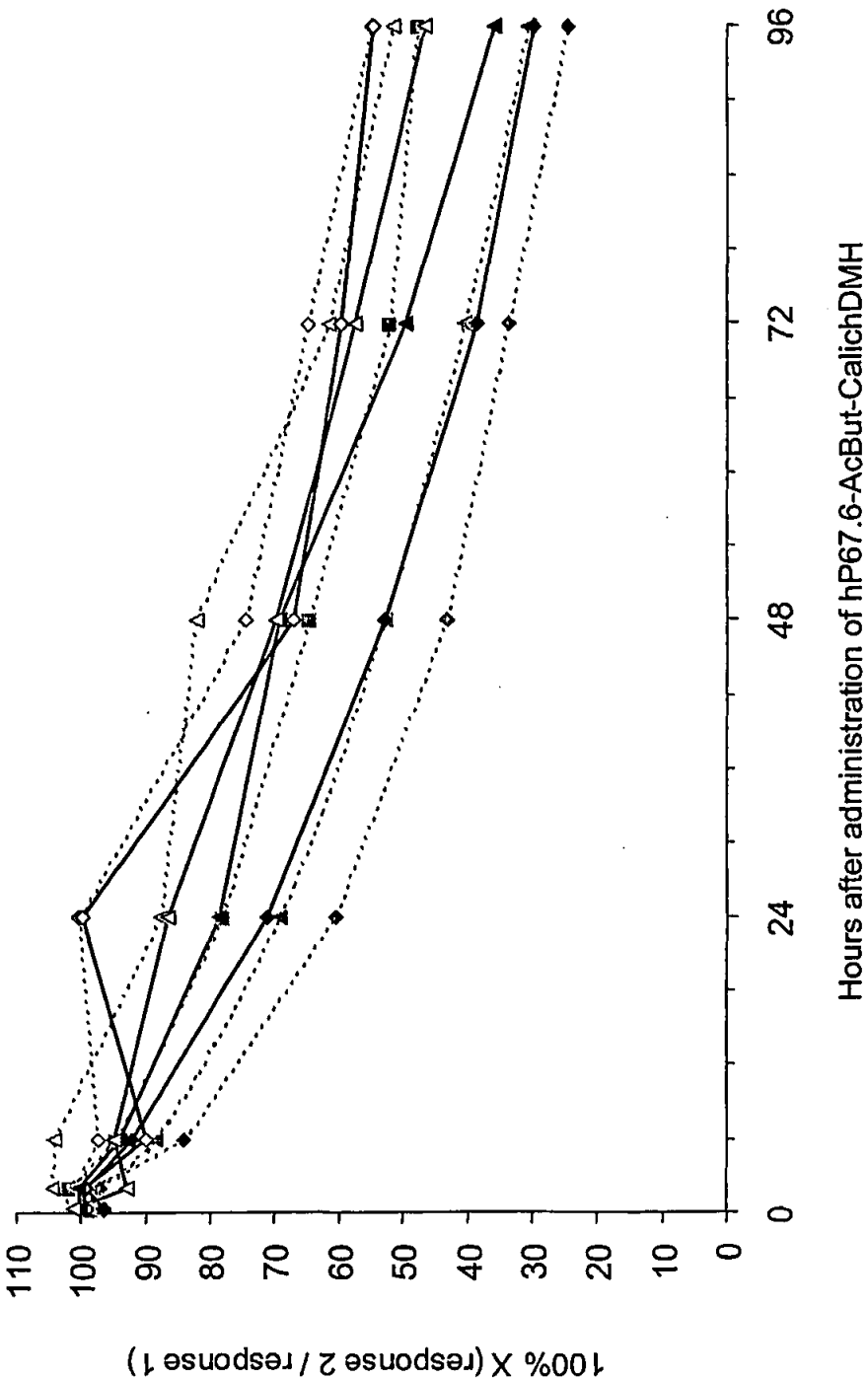
FIG. 3A



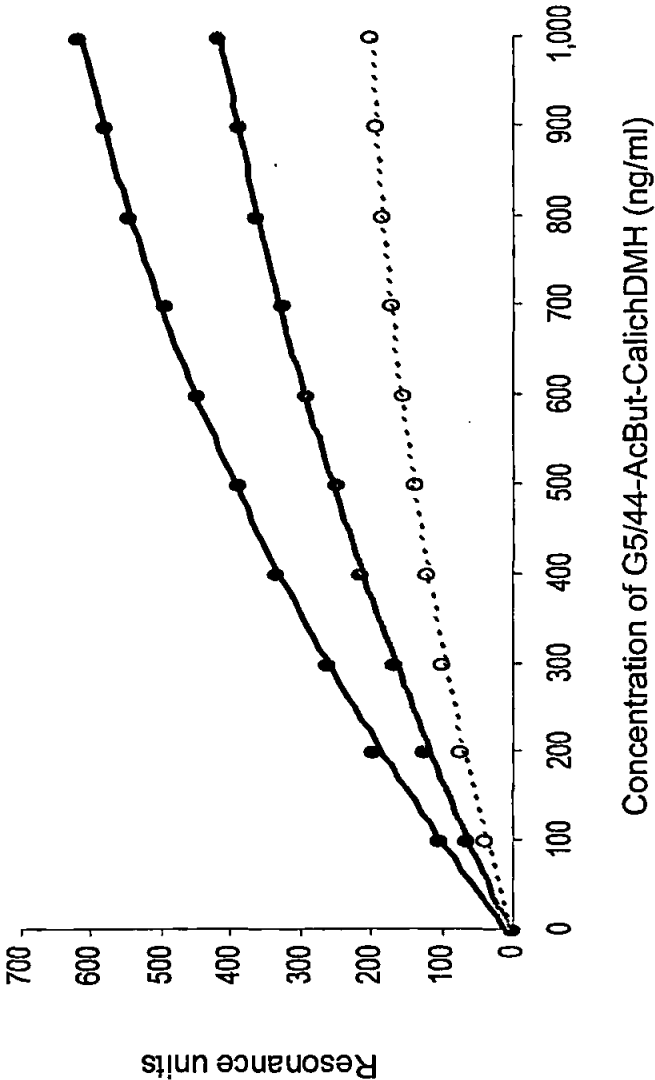
[5/10]  
FIG. 3B



[6/10]  
FIG. 3C

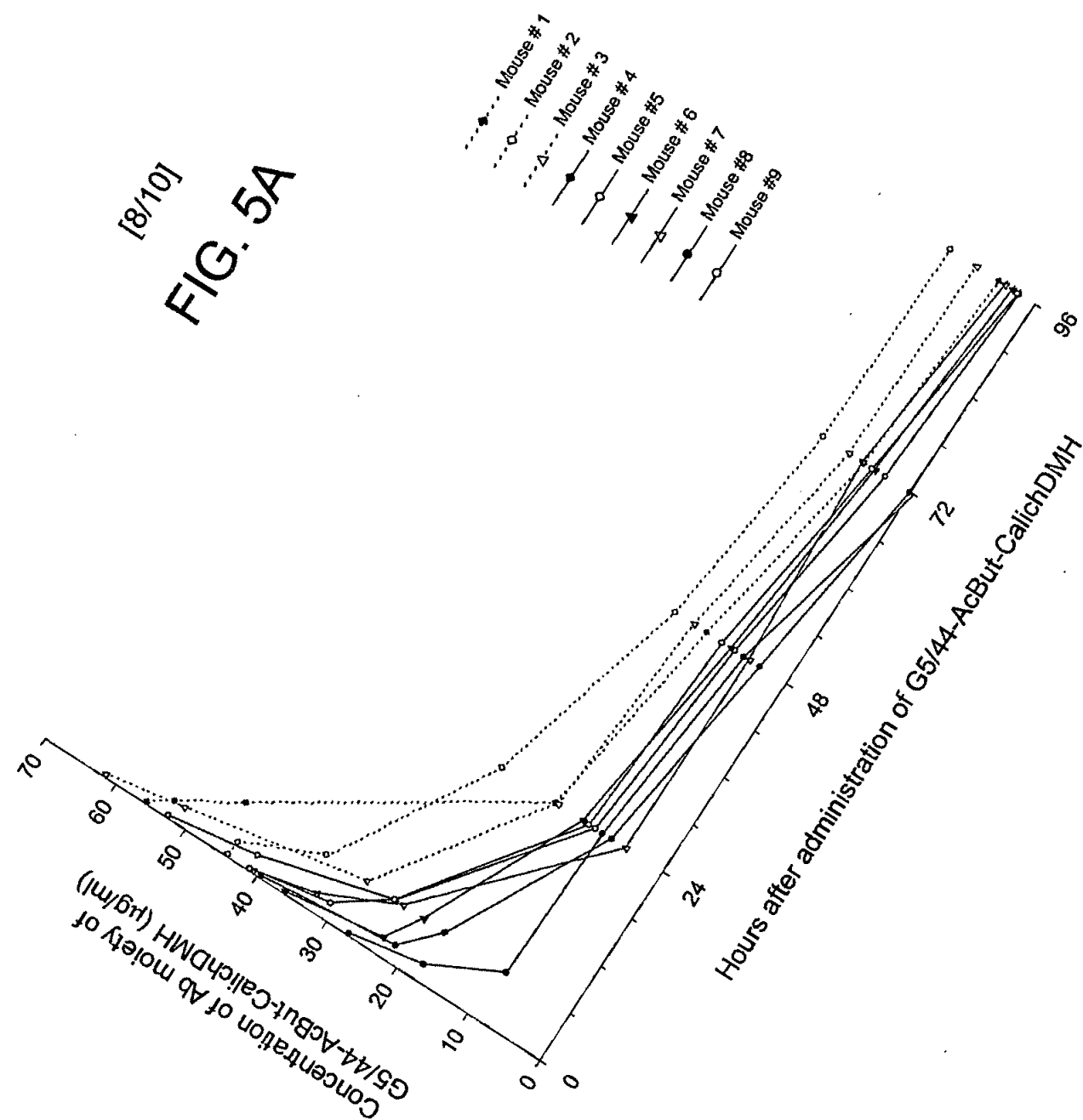


[7/10]  
FIG. 4



[8/10]

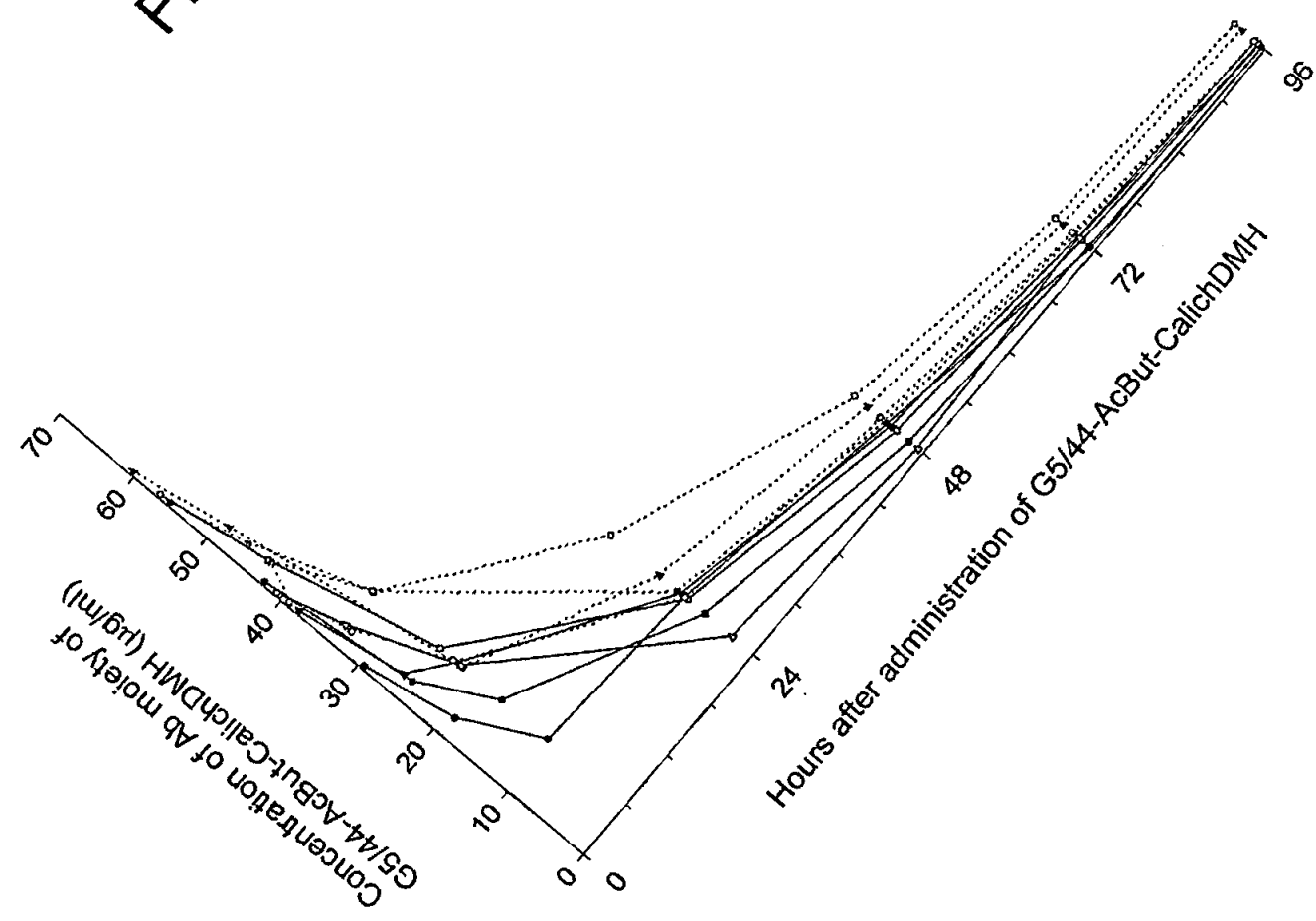
FIG. 5A



91

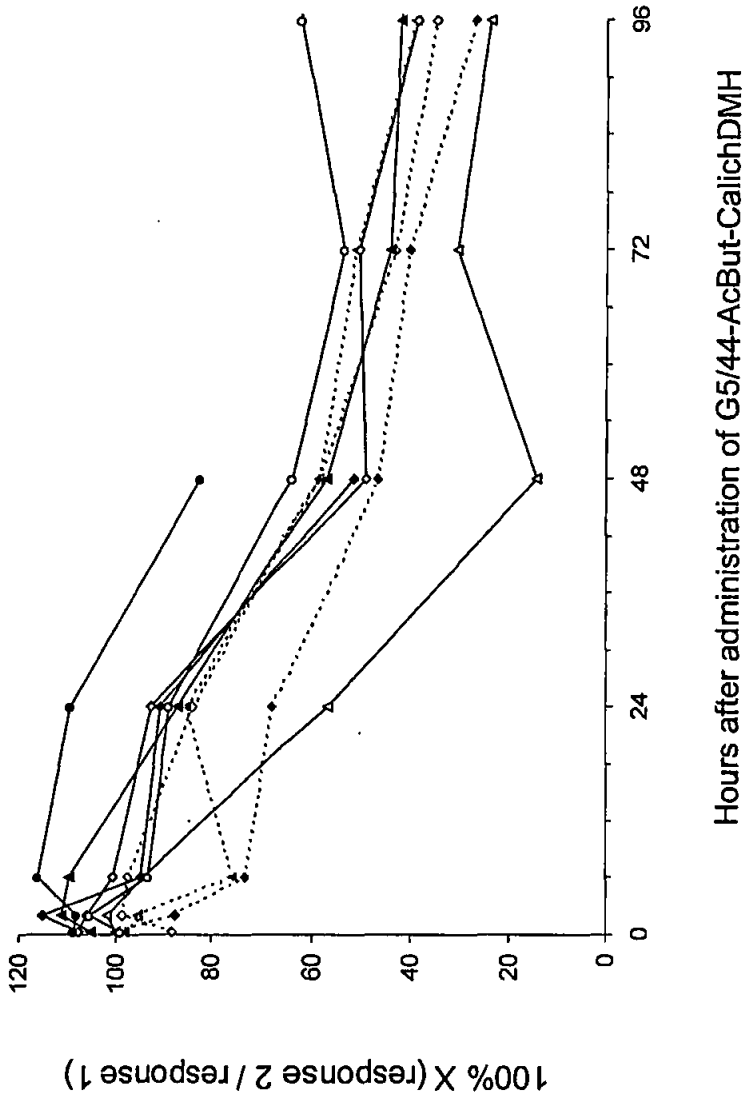
[9/10]

FIG. 5B



[10/10]

FIG. 5C



**METODOS PARA DETERMINAR LAS FARMACOCINETICAS DE TERAPIAS  
DIRIGIDAS**

**CAMPO DE LA INVENCION**

5           La presente invención se refiere en general, a métodos para determinar las propiedades de farmacocinética de terapias dirigidas (por ejemplo, inmunoconjugados), usando técnicas de detección de masa.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10           Las macromoléculas naturales y sintéticas, han llegado a ser terapéuticos establecidos en el tratamiento de cáncer. Los anticuerpos han probado eficacia clínica cuando se administran como un anticuerpo no conjugado o purificado o como un conjugado de anticuerpo/fármaco. De conformidad con  
15 el último procedimiento, un agente terapéutico es acoplado a un anticuerpo con especificidad de enlace por una población celular objetivo definida. Los agentes terapéuticos que han sido conjugados a anticuerpos monoclonales incluyen citotoxinas, modificadores de respuesta biológica, enzimas  
20 (por ejemplo, ribonucleasas), proteínas que inducen apoptosis y péptidos, y radioisótopos.

          El suministro de fármaco mediado por el anticuerpo a células tumorales, aumenta la eficacia del fármaco minimizando su absorción en tejidos normales. Véase por  
25 ejemplo, Reff et al. (2002) *Cancer Control* 9:152-66; Sievers

(2000) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46 Suppl:S18-22;  
Goldenberg (2001) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 39:195-201. El  
MYLOTARG® (ozogamicina gemtuzumab), es una inmunoterapia  
dirigida comercialmente disponible que funciona de  
5 conformidad con este principio y el cual es aprobado para el  
tratamiento de leucemia mieloide aguda en pacientes ancianos.  
Véase Sievers et al. (1999) *Blood* 93: 3678-3684. En este  
caso, la molécula objetivo es un anticuerpo monoclonal anti-  
CD33 que es conjugado a caliqueamicina. Ejemplos adicionales  
10 incluyen, ibritumomab tiuxetano (ZEVALIN®) y tositumomab  
(BEXXAR®), los cuales son anticuerpos anti-CD20  
radioetiquetados. Véase Dillman, *Clin. Exp. Med.*, 2006,  
6(1):1-12.

Debido al progreso en el desarrollo de nuevas  
15 terapias dirigidas al anticuerpo, las características  
fisiológicas que confieren un índice terapéutico favorable en  
la clínica, no son bien entendidas. Ensayos bioquímicos  
simples (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo por su  
antígeno), no necesariamente predicen la eficacia. Véase,  
20 Graff & Wittrup, *Cancer Res.*, 2003, 63(6): 1288-1296. Los  
parámetros biológicos *in vivo*, tales como vida media de  
circulación, proporciones de distribución de tejido, y  
proporcionales de degradación de conjugado, pueden ser más  
útiles en comparación de la eficacia terapéutica potencial de  
25 estas moléculas. Sin embargo, experimentos preclínicos

diseñados para valorar estos parámetros son difíciles, debido a que típicamente requieren números grandes de animales experimentales y radioetiquetado del conjugado.

Para dirigir la necesidad de métodos para predecir la eficacia clínica, la presente invención proporciona ensayos de resonancia de plasmón para caracterización farmacocinética de terapias dirigidas después de su administración a un sujeto. Los ensayos descritos en este documento, detectan exactamente y reproduciblemente, cantidades de moléculas objetivos, y conjugados de molécula/fármaco objetivos en una muestra de volumen mínimo, única. Basados en esta determinación, la vida media de circulación del conjugado de molécula/fármaco objetivo, proporciones de degradación de conjugado, y estabilidad de enlazador pueden ser monitoreadas en un sujeto.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona métodos para determinar una cantidad de molécula objetivo y una cantidad de conjugado de molécula/fármaco objetivo en una muestra. En una modalidad representativa de la invención, el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una superficie en la cual un objetivo es inmovilizado; (b) proporcionar una muestra que comprende una pluralidad de conjugados de molécula/fármaco objetivo; (c)

contactar la muestra con el objetivo inmovilizado en la superficie del soporte sólido; (d) detectar la formación en la superficie, del soporte sólido de un primer complejo enlazante de (i) la molécula objetivo y (ii) el objetivo en la superficie del soporte sólido, en donde la formación del primer complejo enlazante, causa un primer cambio medible en la propiedad de masa del soporte sólido, indicando una cantidad de molécula objetivo en la muestra; (e) contactar el primer complejo enlazante con un agente enlazante al fármaco que específicamente enlaza el fármaco del conjugado de molécula/fármaco objetivo; y (f) detectar la formación en la superficie del soporte sólido, de un segundo complejo enlazante de (i) el agente enlazante al fármaco y (ii) el primer complejo enlazante, en donde la formación del segundo complejo enlazante causa un segundo cambio medible en la propiedad de la masa del soporte sólido, indicando una cantidad de conjugado de molécula/fármaco en la muestra.

Los métodos para determinar una cantidad de conjugado de molécula/fármaco objetivo en una muestra, también pueden comprender las etapas de: (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una superficie en la cual, un primer complejo enlazante es inmovilizado, en donde el complejo enlazante comprende (i) un objetivo y (ii) un conjugado de molécula/fármaco objetivo unido al objetivo; (b) contactar un agente enlazante al fármaco que específicamente

enlaza el fármaco del conjugado de molécula/fármaco objetivo con el primer complejo enlazante inmovilizado en la superficie del soporte sólido; y (c) detectar la formación de un segundo complejo enlazante de (i) el agente enlazante al fármaco y (ii) el primer complejo enlazante en la superficie del soporte sólido, en donde la formación del complejo causa un cambio medible en la propiedad de masa del soporte sólido, indicando una cantidad de conjugado de molécula/fármaco objetivo en la muestra.

10 En otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para determina una cantidad promedio de carga de fármaco por molécula objetivo. Por ejemplo, un método para determinar la carga de fármaco de conjugados de molécula/fármaco en una muestra; pueden comprender las etapas  
15 de: (a) proporcionar un soporte sólido en el cual, los conjugados de molécula/fármaco objetivo de una muestra están unidos; (b) determinar una cantidad de fármaco en la muestra midiendo un cambio en la propiedad de masa de un soporte sólido después del enlace de un agente enlazante al fármaco,  
20 el cual específicamente, enlaza el fármaco del conjugado de molécula/fármaco objetivo, a los conjugados de molécula/fármaco objetivo en la superficie del soporte sólido; y (c) calcular una cantidad promedio de fármaco por conjugado de fármaco/molécula objetivo dividiendo la cantidad  
25 de fármaco de (b) por una cantidad de molécula objetivo en la

muestra.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un sensorgrama de un método de detección intercalado. En la primera fase de la curva (entre la flecha 1 y 2), la muestra del conjugado de anticuerpo/caliqueamicina se corre sobre el antígeno inmovilizado. Una segunda fase (entre la flecha 3 y 4), se inicia agregando un anticuerpo anti-caliqueamicina. La respuesta 1 indica adición de mansa proporcionada a la concentración de anticuerpo en la muestra, y la respuesta 2 es proporcionada a la cantidad de caliqueamicina en el conjugado de anticuerpo/caliqueamicina. RU, unidades de resonancia; círculos grises, periodo de lavado.

Las Figuras 2A-2B muestran la correlación entre la cantidad de anticuerpo o conjugado de fármaco/anticuerpo y la concentración de muestras estándares. La Figura 2A es un sensorgrama que muestra unidades de resonancia como una función de tiempo para cada una de las concentraciones indicadas (ng/ml) de hP67.6-AcBut-CalichDMH. La Figura 2B es una gráfica de líneas que muestra unidades de resonancia como una función de concentración de anticuerpo hP67.6-AcBut-CalichDMH + anti-caliqueamicina (círculos rellenos negros), hP67.6-AcBut-CalichDMH (círculos rellenos grises), y anticuerpo anti-caliqueamicina (círculo abierto).

Las Figuras 3A-3C muestran concentraciones de plasma de hP67.6-AcBut-CalichDMH determinado usando un método de detección intercalado como se describe en los Ejemplos 3 y 4. Cada animal recibió conjugado de anticuerpo/fármaco por una dosis total de 3 µg de caliqueamicina. La dosis de conjugado de anticuerpo/fármaco expresada en mg/kg es indicada. Líneas sólidas, animales que portan tumores Ramos CD22 positivos; líneas punteadas, ratones libres de tumor.

La Figura 3A muestra la respuesta 1, es decir, enlace de hP67.6 y hP67.6-AcBut-CalichDMH, a antígeno CD33 inmovilizado en un chip CM5.

La Figura 3B muestra la respuesta 2, es decir, enlace de anti-caliqueamicina a hP67.6-AcBut-CalichDMH ya unida a CD33 inmovilizada en un chip CM5. Las cinéticas de hP67.6-AcBut-CalichDMH en plasma, son similares en animales que porta tumor y libres de tumor.

La Figura 3C muestra la relación de respuesta 2 con relación a la respuesta 1. La declinación de concentración de conjugado de anticuerpo/fármaco como una fracción de la concentración de la porción de anticuerpo del conjugado de anticuerpo/fármaco, indica la separación preferencial de anticuerpo no conjugado contra el conjugado.

La Figura 4 es una gráfica de línea que muestra unidades de resonancia como una función de concentración de G5/44-AcBut-CalichDMH (ozogamicina inotuzumab) + anticuerpo

anti-caliqueamicina (círculo relleno negro), G5/44-AcBut-CalichDMH (círculo relleno gris) y anticuerpo anti-caliqueamicina (círculo abierto).

Las Figuras 5A-5C muestran concentraciones de G5/44-AcBut-CalichDMH determinadas usando un método de detección intercalado como se describe en los Ejemplos 3 y 5. El anticuerpo anti-CD22 G5/44 fue cargado con 72 µg de caliqueamicina por mg de anticuerpo, y cada animal recibió conjugado de anticuerpo/fármaco para una dosis total de 3 µg de caliqueamicina. Líneas sólidas, animales que portan tumores Ramos CD22-positivos; líneas punteadas, tumores libres de tumor.

La Figura 5A muestra la respuesta 1, es decir, enlace de G5/44 y G5/44-AcBut-CalichDMH al antígeno CD22 inmovilizado en un chip CM5.

La Figura 5B muestra la respuesta 2, es decir, el enlace de anti-caliqueamicina a G5/44-AcBut-CalichDMH ya unido a CD22 inmovilizado en un chip CM5. La presencia del tumor Ramos CD22 positivo (líneas sólidas), reduce la concentración promedio de anticuerpo G5/44 y conjugados G5/44-AcBut-CalichDMH en plasma.

La Figura 5C muestra la relación de respuesta 2 con relación a la respuesta 1. El decline de concentración de conjugado de anticuerpo/fármaco como una fracción de la concentración de la porción de anticuerpo del conjugado de

anticuerpo/fármaco, indica la separación preferencial de conjugado contra el anticuerpo no conjugado. La remoción de caliqueamicina a partir del anticuerpo no fue influenciada por la presencia del tumor Ramos  
5 CD22-positivo.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona métodos para caracterización de muestras que comprenden composiciones para terapia dirigida, es decir, una molécula objetivo conjugada  
10 ya sea directamente o indirectamente a un fármaco. Las muestras que contienen conjugados de molécula/fármaco objetivo, pueden incluir alguna proporción de las partes constituyentes (es decir, molécula objetivo no conjugada y fármaco libre), por ejemplo, como un resultado de conjugación  
15 incompleta, degradación del conjugado, etc. En general, la molécula objetivo no conjugada y fármaco libre, cada uno tiene eficacia limitada y puede contribuir a toxicidad del paciente. Por consiguiente, para monitorear el progreso en pacientes que reciben terapias dirigidas, la carga de fármaco  
20 y la concentración del conjugado de molécula/fármaco objetivo (preferentemente las partes constituyentes), es importante. Los métodos descritos se proporcionan para tal determinación, los cuales pueden ser usados para valorar parámetros de farmacocinética de un conjugado de molécula/fármaco objetivo,  
25 tal como absorción, distribución, metabolismo y excreción,

después de la administración a un sujeto.

Comparado con métodos previos, la presente descripción describe el uso de una técnica de detección de masa para detectar conjugados de molécula/fármaco objetivo, en donde tales conjugados son lábiles. La concentración de conjugados de molécula/fármaco objetivo, puede ser exactamente determinada en suero y/o en el sitio objetivo para valorar la vida media de circulación, estabilidad enlazadora, y una cantidad de fármaco que es suministrada en el sitio objetivo. Una muestra de bajo volumen, única, puede ser usada para realizar secuencialmente etapas de detección múltiples en una misma muestra, la cual permite la circulación de carga de fármaco en el conjugado de molécula/fármaco objetivo.

#### 15 I. Conjugados de Molécula/Fármaco Objetivo

Las moléculas objetivo que pueden ser usadas en los métodos descritos incluyen, cualquier molécula que muestra enlace específico a un objetivo. El enlace específico se refiere a una afinidad entre dos moléculas, la cual resulta en enlace preferencial en una muestra heterogénea. El enlace es en general, caracterizado por una afinidad de al menos, aproximadamente  $10^{-7}$  M o superior, tal como al menos aproximadamente  $10^{-8}$  M o superior, o al menos aproximadamente  $10^{-9}$  M o superior, o al menos aproximadamente  $10^{-11}$  M o superior, o al menos aproximadamente  $10^{-12}$  M o superior.

Las moléculas objetivo también incluyen cualquier molécula que, después de la administración a un sujeto, se enlaza selectivamente a células que expresan el objetivo. El término objetivo se refiere al movimiento preferencial y/o  
5 acumulación *in vivo* de una molécula en un sitio objetivo (por ejemplo, células o tejidos), comparados con un sitio de control). Un sitio objetivo comprende células que expresan un objetivo, es decir, un sitio propuesto para acumulación de la molécula objetivo o conjugado de molécula/fármaco objetivo.  
10 Un sitio de control comprende células que carecen sustancialmente de la expresión del objetivo y las cuales por lo tanto, carecen sustancialmente de enlace y/o acumulación de una molécula objetivo administrada o conjugado de molécula/fármaco objetivo. El enlace selectivo en general, se  
15 refiere a una localización preferencial de un conjugado de molécula/fármaco objetivo, de manera tal que una cantidad de molécula objetivo en un sitio objetivo es aproximadamente 2 veces mayor que una cantidad de molécula objetivo en un sitio de control, o aproximadamente 5 veces mayor, o  
20 aproximadamente 10 veces mayor o más.

Moléculas objetivo representativas incluyen anticuerpos, proteínas, péptidos, miméticos de péptidos, ácidos nucleicos de péptidos (PNAS), oligonucleótidos, ligandos, lectinas, y cualquiera de otras moléculas que  
25 específicamente y/o selectivamente, se enlazan a un objetivo.

Los objetivos unidos por moléculas objetivas son en general, asociados con un estado de enfermedad, un estado susceptible de enfermedad, o una condición que requiere tratamiento. Objetivos representativos incluyen antígenos, 5 haptenos, proteínas, péptidos, receptores, oligonucleótidos, carbohidratos, y cualquiera de otras moléculas expresadas a niveles elevados por células de un sitio objetivo. Un sitio objetivo está preferiblemente presente en la superficie celular, o de otro modo, accesible a moléculas objetivo. Un 10 sitio objetivo puede ser localizado, tal como en un tumor sólido, o no localizado como en malignidades hematológicas. Por ejemplo, un sitio objetivo puede comprender células que expresan antígenos asociados al tumor (TAA), antígenos expresados en otras células malignas, células inmunes que 15 contribuyen a inflamación, alergia, autoinmunidad, etc.

En un aspecto de la invención, la molécula objetivo es un anticuerpo y la invención se refiere a caracterización de muestras que comprenden inmunoconjugados, es decir, conjugados de anticuerpo/fármaco. La porción de anticuerpo de 20 un conjugado de anticuerpo/fármaco, puede comprender cualquier tipo de anticuerpo, que incluye por ejemplo, anticuerpos que tienen estructura tetramérica (por ejemplo, similar a anticuerpos que se originan naturalmente), o cualquier otra estructura que tiene al menos, una región 25 variable de cadena ligera de inmunoglobulina o al menos, una

región de cadena pesada de inmunoglobulina, o fragmentos del mismo enlazantes al antígeno (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab modificados, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, o Fv). Los métodos descritos pueden también ser usados para caracterizar conjugados  
5 preparados usando anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, diacuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos tetravalentes, y/o anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

Para la preparación de terapias anti-cancerígenas  
10 dirigidas, los antígenos asociados al tumor han sido identificados que se enlazan específicamente a células cancerígenas a partir de tumores sólidos, tales como carcinoma de pulmón escamoso/adenomatoso (carcinoma de pulmón de células no pequeñas), carcinoma de mama invasivo,  
15 carcinoma colorectal, carcinoma gástrico, carcinoma cervical escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma de páncreas invasivo, carcinoma de ovario, carcinoma vesical escamoso y coriocarcinoma. Antígenos para terapia dirigida de malignidades hematológicas pueden también ser objetivos de  
20 fármacos útiles, por ejemplo, para el tratamiento de linfomas y leucemias, tales como que incluyen pero no se limitan a, linfoma no Hodgking de bajo grado/folicular (NHL), NHL linfocítico pequeño (SL), NHL grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de alto  
25 grado, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de células no

desdobladas pequeñas de alto grado, NHL de enfermedad voluminosa y Macroglobulinemia de Waldenstrom, leucemia leucocítica crónica, leucemia mielogenosa aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia  
5 mielogenosa crónica, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia monocítica, leucemia mielogenosa y leucemia promielocítica.

Anticuerpos representativos que pueden ser usados para preparar conjugados de anticuerpo/fármaco para terapia  
10 objetivo incluyen, anticuerpos anti-5T4, anticuerpos anti-CD19, anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, RITUXAN®, ZEVALIN®, BEXXAR®), anticuerpos anti-CD22, anticuerpos anti-CD33 (por ejemplo, MYLOTARG®), anticuerpos anti-Lewis Y (por ejemplo, Hu3S193, Mthu3S193, AGmthu3S193), anticuerpos anti-  
15 HER-2 (por ejemplo, HERCEPTIN® (trastuzumab), MDX-210, OMNITARG® (pertuzumab, rhuMab 2C4)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH®), anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, ERBITUX® (cetuximab), ABX-EGF (panitumumab)), anticuerpos anti-VEGF (por ejemplo, AVASTIN® (bevacizumab)), anticuerpos  
20 de complejo anti-DNA/histona (por ejemplo, ch-TNT-1/b), anticuerpos anti-CEA (por ejemplo, CEA-Cide, YMB-1003), hLM609, anticuerpos anti-CD47 (por ejemplo, 6H9), anticuerpos anti-VEGFR2 (o receptor que contiene el dominio de inserto cinasa, KDR) (por ejemplo, IMC-1C11), anticuerpos anti-Ep-CAM  
25 (por ejemplo, ING-1), anticuerpos anti-FAP (por ejemplo,

sibrotuzumab), anticuerpos anti-DR4 (por ejemplo, TRAIL-R), anticuerpos del receptor anti-progesterona (por ejemplo, 2C5), anticuerpos anti-CA19.9 (por ejemplo, GIVAREX®), y anticuerpos anti-fibrina (por ejemplo, MH-1).

5           Como se usa en este documento, un fármaco se refiere a cualquier sustancia que tiene actividad biológica o detectable, por ejemplo, agentes terapéuticos, agentes enlazantes, etc., así como también profármacos, los cuales son metabolizados a un agente activo *in vivo*. El término  
10 fármaco también incluye derivados de fármaco, en donde un fármaco ha sido funcionalizado para permitir la conjugación con una molécula objetivo.

          El fármaco puede ser unido a una molécula objetivo ya sea directamente o indirectamente, pero el enlace es tal  
15 que es compatible con preservar el efecto terapéutico de la porción de fármaco. El enlazador puede ser estable o hidrolizable, y cualquier técnica adecuada para enlazar el fármaco al anticuerpo, puede ser usada. Por ejemplo, las hidrazidas y otros nucleófilos pueden ser conjugados a los  
20 aldehídos generados por oxidación de los carbohidratos que ocurren naturalmente en los anticuerpos. Los conjugados que contienen hidrazona pueden ser elaborados con grupos carbonilos introducidos, que proporcionan las propiedades de liberación de fármaco deseado. Los conjugados pueden también  
25 ser elaborados con un enlazador que tiene un disulfuro en un

extremo, una cadena alquilo en la mitad y un derivado hidrazina en el otro extremo. Otros enlazadores representativos son enlazadores tiol-reactivos, tales como ésteres, amidas y acetales/cetales, y enlazadores sensibles a  
5 pH, tales como cis-aconitatos, los cuales tienen un ácido carboxílico en yuxtaposición con un enlace amida. Los enlazadores también pueden incluir agentes solubilizantes tales como PEG para limitar la agregación de los conjugados de fármaco/molécula objetivo. Los enlazadores peptídicos  
10 también pueden ser usados.

Fármacos representativos incluyen agentes anti-cancerígenos, tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunomoduladores, agentes anti-angiogénicos, agentes anti-proliferativos, agentes pro-  
15 apoptóticos, enzimas y proteínas bioactivas. Un fármaco puede también comprender un ácido nucleico terapéutico, tal como un gen que codifica un agente inmunomodulador, un agente anti-angiogénico, un agente anti-proliferativo, o un agente pro-apoptótico. Estos descriptores de fármaco no son mutuamente  
20 exclusivos, y de este modo, un agente terapéutico puede ser descrito usando uno o más de los términos notados anteriormente. Los agentes terapéuticos pueden ser preparados como sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores, farmacéuticamente aceptables. Además, los  
25 conjugados pueden ser elaborados usando portadores

secundarios tales como el agente citotóxico, tales como liposomas o polímeros, por ejemplo.

El término agente citotóxico en general, se refiere a un agente que inhibe o previene la función de células y/o resulta en la destrucción de las células. Los agentes citotóxicos representativos incluyen antibióticos, inhibidores de polimerización de tubulina, agentes de alquilación que se enlazan a y rompen el ADN, y agentes que rompen la síntesis de proteína o la función de proteínas celulares esenciales tales como, proteínas cinasas, fosfatasas, topoisomerasas, enzimas y ciclinas. Por ejemplo, los agentes citotóxicos incluyen pero no se limitan a, doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carubicina, nogalamycin, menogaril, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougierotina, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbazona, metotrexato, flurouracilos, etopósido, taxol, análogos de taxol, platinos tales como cis-platino y carboplatino, mitomicina, tiotepa, taxanos, vincristina,

daunorubicina, epirubicina, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifen, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemiasterlinas, esperamicinas y maitansinoides.

5           En aspectos particulares de la invención, los conjugados de molécula/fármaco objetivo caracterizados usando los métodos descritos, comprenden una porción de fármaco anticuerpo tal como una caliqueamicina, también llamada complejo LL-E33288, por ejemplo, gama-caliqueamicina o un  
10 derivado menos potente, N-acetilgama caliqueamicina. Véase, Patente Estadounidense No. 4,970,198. Ejemplos adicionales de caliqueamicinas adecuadas para uso en candidatos de molécula/fármaco objetivo, se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,671,958; 5,053,394; 5,037,651;  
15 5,079,233; y 5,108,912; las cuales están cada una incorporada en este documento en su totalidad. Análogos de disulfuro de caliqueamicina, también pueden ser usados, por ejemplo, análogos descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,606,040 y 5,770,710, las cuales son cada una incorporadas  
20 en este documento en su totalidad. Técnicas representativas para la preparación de conjugados de anticuerpo/caliqueamicina como se expone en el Ejemplo 1, se describen por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,712,374; 5,714,586; 5,773,001; y 5,877,296; Patentes  
25 Estadounidenses Nos. 2004-0082764-A1 y 2006-0002942-A1; y

Publicación de PCT No. WP 2005/089809, las cuales son cada una incorporadas en este documento en su totalidad.

Agentes inmunomoduladores que pueden ser usados para preparara conjugados de molécula/fármaco objetivo incluyen, anti-hormonas que bloquean la acción de la hormona en tumores y agentes inmunosupresivos que suprimen la producción de citocina, expresión auto-antígeno regulada descendentemente, o antígenos MHC enmascarados. Anti-hormonas representativas incluyen, anti-estrógenos que incluyen por ejemplo, tamoxifen, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasa, 4-hidroxitamoxifen, trioxifeno, ceoxifeno, LI 117018, onapnston, y toremifeno; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprólido, y goserelina; y agentes anti-adrenales. Agentes inmunosupresivos representativos incluyen, 2-amino-6-aril-5-pirimidinas sustituidas, azatioprina, ciclofosfamida, bromocriptina, danazol, dapsona, glutaraldehído, anticuerpos anti-idiotípicos para antígenos MHC y fragmentos MHC, ciclosporina A, esteroides tales como glucocorticoesteroides, citocina o antagonistas del receptor de citocina (por ejemplo, anticuerpos anti-interferona, anticuerpos anti-IL10, anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , anticuerpos anti-IL2), estreptocinasa, TGF $\beta$ , rapamicina, receptor de células T, fragmentos del receptor de células T y anticuerpos del receptor de células T.

Agentes anti-angiogénicos representativos incluyen, inhibidores de la formación de bazo sanguíneos, por ejemplo, inhibidores de farnesiltransferasa, inhibidores COX-2, inhibidores VEGF, inhibidores bFGF, inhibidores de sulfatasa esteroide (por ejemplo, bis-fulfamato de 2-metoxioestradiol (2-MeOE2bisMATE)), interleucina-24, tromboespondina, proteínas de metaloespondinas, interferonas clase I, interleucina 12, protamina, angiostatina, laminina, endostatina, y fragmentos de prolactina.

Agentes anti-proliferativos y agentes pro-apoptóticos incluyen activadores de PPAR-gamma (por ejemplo, prostaglandinas de ciclopentenona (cyPGs)), retinoides, triterpinoides (por ejemplo, cicloartano, lupano, ursano, oleanano, friedelano, dammarano, cucurbitacina, y triterpenoides limonoides), inhibidores del receptor EGF (por ejemplo, HER4), rampamicina, CALCITRIOL® (1,25-dihidroxicolecalciferol (vitamina D)), inhibidores de aromatasa (FEMARA® (letrozona)), inhibidores de telomerasa, queladores de hierro (por ejemplo, tiosemicarbazona de 3-aminopiridin-2-carboxaldehído (Triapina)), apoptina (proteína viral 3-VP3 de virus de anemia de pollo), inhibidores de Bcl-2 y Bcl-X(L), TNF-alfa, ligando FAS, ligando que induce apoptosis relacionado con TNF (TRAIL/Apo2L), activadores de señalización de TNF-alfa/ligando FAS/ligando que induce apoptosis relacionado con TNF (TRAIL/Apo2L), e inhibidores de

la señalización de la trayectoria de supervivencia PI3K-Akt (por ejemplo, UCN-01 y geldanamicina).

Agentes quimioterapéuticos representativos incluyen, agentes de alquilación tales como tiotepa y  
5 ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziidinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y  
10 trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecioretamina, clorhidrato de óxido de mecioretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas  
15 tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinias, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliceamicinas, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina,  
20 daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina,  
25 tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-

metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU);  
análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato,  
pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como  
fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina;  
5 análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-  
azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina,  
doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-EU; andrógenos  
tales como calusterona, propionato de dromoestanolona,  
epítioestanol, mepítioestano, testolactona; anti-adrenales  
10 tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano;  
rellenadores de ácido fólico tales como ácido frolínico;  
aceglatona; glicósido aldofosfarnido; ácido aminolevulínico;  
amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina;  
demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio;  
15 etoglucido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano;  
lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina;  
pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-  
etilhidrazida; procarbazona; razoxano; sizofiran;  
espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2'-  
20 triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina;  
manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman;  
gacitosina; arabinósido (Ara-C); ciclofosfamida; tiotepa;  
taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers  
Squibb Oncology of Princeton, New Jersey) y doxetaxel  
25 (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer de Antony, Francia);

clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; 5 vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aininopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; y capecitabina.

Agentes terapéuticos adicionales que pueden ser  
10 conjugados a moléculas objetivo y caracterizados usando los métodos descritos en este documento incluyen, agentes fotodetectores (Publicación de Patente Estadounidense No. 2002/0197262 y Patente Estadounidense No. 5,952,329) para terapia fotodinámica; péptidos magnéticos para termoterapia  
15 (Solicitud de Patente Estadounidense No. 2003/0032995); agentes enlazantes, tales como péptidos, ligandos, ligandos de adhesión celular, etc., y profármacos tales como profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos  
20 que contienen péptido, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de fluorouridina que pueden ser convertidos al fármaco libre citotóxico más  
25 activo.

## II. Farmacocinéticas de Conjugados de Molécula/Fármaco

### Objetivo

La presente invención proporciona métodos para determinar la carga de fármaco de una molécula objetivo, por ejemplo, para determinar si la reacción de conjugación es lograda en un nivel de carga de fármaco el cual comprende una dosis efectiva, es decir, una cantidad de conjugado de molécula/fármaco objetivo suficiente para provocar una respuesta biológica deseada, y para mantener la consistencia lote a lote de conjugados de molécula/fármaco objetivo comercialmente manufacturado. Para valorar la liberación de fármaco o estabilidad de conjugados de molécula/fármaco objetivo, la carga de fármaco puede también ser valorada después de la administración a un paciente, por ejemplo, usando una muestra de sangre a partir del paciente.

Como se describe en este documento, una cantidad de conjugado de molécula/fármaco objetivo puede ser calculada a partir de las determinaciones separadas de (i) una cantidad de molécula objetivo y (ii) una cantidad de conjugado de molécula/fármaco objetivo en la misma muestra. Las etapas (i) y (ii) son descritas en este documento posteriormente más completamente bajo los subencabezados II.A y II.B, respectivamente. Véase también la Figura 1. Brevemente, el método incluye medición de dos respuestas consecutivas. Una primera respuesta determina el número de unidades de

resonancia después de contactar una muestra que contienen los conjugados de molécula/fármaco objetivo sobre un dispositivo detector de masa, tal como un chip BIACORE®, con objetivo inmovilizado reconocido por la molécula objetivo del conjugado. Esta respuesta es proporcional a la suma de la molécula objetivo conjugada y libre (no conjugada) en la muestra. Se obtiene una segunda respuesta después de contactar secuencialmente un agente enlazante al fármaco con las moléculas objetivo conjugadas y no conjugadas unidas al objetivo inmovilizado en el mismo dispositivo detector de masa. Esta segunda respuesta es proporcional a la cantidad de fármaco presente como conjugados de molécula/fármaco objetivo en la muestra.

De conformidad con los métodos descritos, cualquier técnicas detectora de masa adecuada, puede ser usada. Técnicas representativas conocidas en el arte incluyen, métodos piezoeléctrico, ópticos, termo-ópticos, de ondas acústicas de superficie (SAW), así como también métodos electroquímicos, tales como métodos potenciométricos, voltamétricos, conductométricos, amperométricos y de capacitancia.

Los métodos ópticos que pueden ser usados incluyen, métodos para detectar concentración de superficie de masa (o índice refractivo), tales como métodos de reflexión-ópticos, que incluyen métodos de reflexión tanto interna como externa,

por ejemplo, espectroscopía de ondas de elipsometría y evanescentes (EWS), el último incluye resonancia de plasmón de superficie (SPR), refractometría de ángulo Brewster, refractometría de ángulo crítico, reflexión total frustrada (FTR), elipsometría de onda evanescente, reflexión interna total difuminada (STIR), sensores guía de ondas ópticas, formación de imágenes a base de onda evanescente, tales como formación de imágenes resultas por ángulo crítico, formación de imágenes resueltas por ángulo Brewster, formación de imágenes resueltas por ángulo SPRI, etc., así como también métodos a base de fluorescencia evanescente (TIRF) y fosforescencia.

Por ejemplo, para estimar la constante de equilibrio de una molécula objetivo en una muestra, se puede usar la siguiente técnica detectora de masa. Primero, una serie de concentración (por ejemplo, 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ng/ml) de la molécula objetivo, se prepara y se inyecta secuencialmente en un biosensor que tiene un chip sensor operativamente asociado con éste, en donde el chip sensor tiene una superficie detectora de referencia y al menos, una superficie detectora con objetivo inmovilizado. Las respuestas relativas a niveles enlazantes de estado listo para cada concentración de molécula objetivo, son medidos. Debido a las contribuciones de índice refractivo de volumen a partir de aditivos

solventes en amortiguador de corrida de biosensor, un factor de corrección puede ser calculado (vía procedimientos de calibración conocidos) y aplicados para dar las respuestas relativas corregidas. Las respuestas relativas corregidas para cada concentración de molécula objetivo son entonces matemáticamente evaluadas como se aprecia por aquellos expertos en la técnica, para estimar la constante de equilibrio de la molécula objetivo.

En un aspecto particular de la invención, la técnica detectora de masa es resonancia de plasmón de superficie, la cual puede ser realizada usando un instrumento BIACORE® (Biacore AB de Uppsala, Suecia). El aparato y el antecedente teórico, son descritos en, Jonsson et al., BioTechniques, 1991, 11:620-627. Esta técnica involucra inmovilizar un primer asociado de enlace de un par enlazante a un chip sensor, contactar el chip sensor con una muestra que contiene un segundo asociado de enlace del par enlazante, y después medir un cambio resultante en las características ópticas de superficie del chip sensor.

En general, un soporte sólido comprende un revestimiento de matriz de hidrogel acoplado a la superficie superior del soporte sólido, en donde el revestimiento de matriz de hidrogel tiene una pluralidad de grupos funcionales. Para uso con un instrumento BIACORE®, el soporte sólido está preferiblemente, en la forma de un chip sensor,

en donde el chip sensor tiene un metal de electrón libre interpuesto entre la matriz de hidrogel y la superficie superior. Los metales de electrones libres adecuados para este propósito incluyen, cobre, plata, aluminio y oro.

5           En un aspecto particular de la invención, el método puede comprender las etapas de: (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una superficie en la cual un objetivo es inmovilizado; (b) proporcionar una muestra que comprende una pluralidad de conjugados de molécula/fármaco objetivo; (c)  
10   contactar la muestra con el objetivo inmovilizado a la superficie del soporte sólido; (d) detectar la formación en la superficie del soporte sólido de un primer complejo enlazante de (i) la molécula objetivo y (ii) el objetivo en la superficie del soporte sólido, en donde la formación del  
15   primer complejo enlazante causa un primer cambio medible en la propiedad de masa del soporte sólido indicando una cantidad de molécula objetivo en la muestra; (e) contactar el primer complejo enlazante con un anticuerpo anti-fármaco o fragmento enlazante al fármaco del mismo; y (f) detectar la  
20   formación en la superficie del soporte sólido, de un segundo complejo enlazante de (i) el anticuerpo anti-fármaco o fragmento enlanzante al fármaco del mismo y (ii) el primer complejo enlazante, en donde la formación del segundo complejo enlazante causa un segundo cambio medible en la  
25   propiedad de masa del soporte sólido, indicando una cantidad

de conjugado de molécula/fármaco objetivo en la muestra.

En otro aspecto de la invención, un método para determinar una cantidad promedio de carga de fármaco por anticuerpo en una muestra de conjugados de molécula/fármaco objetivos, puede comprender las etapas de: (a) proporcionar un soporte sólido al cual los conjugados de molécula/fármaco objetivo de una muestra están unidos; (b) determinar una cantidad de fármaco en la muestra midiendo un cambio en la propiedad de masa de un soporte sólido después del enlace de un anticuerpo anti-fármaco o fragmento enlazante al fármaco del mismo a los conjugados de molécula/fármaco objetivos en la superficie del soporte sólido; y (c) calcular una cantidad promedio de fármaco por conjugado de molécula/fármaco objetivo dividiendo la cantidad de fármaco de (b) por una cantidad de molécula objetivo en la muestra. Cuando se considera como una función de tiempo después de la administración a un sujeto, este método es útil para valorar la vida media de circulación de un conjugado de molécula/fármaco objetivo y estabilidad de enlazador.

Usando los métodos descritos, los conjugados de molécula/fármaco objetivo, fueron detectados en muestras de suero a un nivel de 100 hasta 1,000 ng/ml de molécula objetivo. Como se describe en los Ejemplos 4 y 5, los valores PK de los conjugados de molécula/fármaco objetivo, fueron reproduciblemente determinados en muestras individuales. La

presencia de un tumor que expresa un objetivo reduce la vida media de circulación de un conjugado de molécula/fármaco objetivo con especificidad para el objetivo, pero no tiene efecto en la vida media de circulación de un conjugado de molécula/fármaco objetivo que tiene diferente especificidad. Compare las Figuras 5B y 3B, respectivamente. La reducción de la vida media de circulación puede ser atribuible a la retención del conjugado de molécula/fármaco objetivo en la presencia de un objetivo apropiado.

10      IIA. Métodos para Determinar una Cantidad de Molécula  
Objetivo en una Muestra que Comprende Conjugados de  
Molécula/Fármaco Objetivo

La presente invención proporciona métodos para determinar una cantidad de molécula objetivo en una muestra que comprende, una pluralidad de conjugados de molécula/fármaco objetivo. En un aspecto particular de la invención, el método comprende las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una superficie en la cual un objetivo es inmovilizado; (b) proporcionar una muestra que comprende una pluralidad de conjugados de molécula/fármaco objetivo; (c) contactar la muestra con el objetivo inmovilizado en la superficie del soporte sólido; y (d) detectar la formación de un complejo enlazante de (i) moléculas objetivo en la muestra y (ii) el objetivo en la superficie del soporte sólido, en donde la formación del

complejo enlazante causa un cambio medible en la propiedad de masa del soporte sólido.

Ejemplos representativos que pueden ser usados de conformidad con los métodos descritos incluyen, preparaciones de conjugado de molécula/fármaco objetivo, es decir, una muestra que comprende una reacción de conjugación entre una molécula objetivo y un fármaco, el cual puede incluir, molécula objetivo conjugada, molécula objetivo no conjugada y fármaco libre. Muestras obtenidas a partir de un sujeto después de la administración de anticuerpos al sujeto, también pueden ser usadas, por ejemplo, muestras de sangre, suero u orina. La muestra puede comprender un volumen líquido mínimo, tal como una muestra de menos de aproximadamente 100  $\mu$ l, o menos de aproximadamente 50  $\mu$ l, o menos de aproximadamente 25  $\mu$ l, o menos de aproximadamente 10  $\mu$ l, o menos de aproximadamente 5  $\mu$ l. Los volúmenes de muestras más grandes pueden ser usados para incrementar la sensibilidad. Una muestra puede también comprender un extracto líquido preparado a partir de una muestra de tejido, tal como un tumor. Por ejemplo, una muestra puede ser preparada a partir de un carcinoma de pulmón escamoso/adenomatoso (carcinoma de pulmón de células no pequeñas), carcinoma de mama invasivo, carcinoma colorectal, carcinoma gástrico, carcinoma cervical escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma de páncreas invasivo, carcinoma de ovario, carcinoma vesical

escamoso, coriocarcinoma, u otros carcinomas de bronquios, mama, colon, recto, estómago, cerviz, endometrio, páncreas, ovario, corio, y vesículas seminales.

IIB. Métodos para Determinar una Cantidad de Fármaco en  
5 una Muestra que Comprende Conjugados de Molécula/Fármaco  
Objetivo

Para determinar una cantidad de fármaco en una muestra, se usan conjugados de molécula/fármaco objetivo son unidos a un chip detector de masa, y se usa un agente  
10 enlazante al fármaco que se enlaza específicamente a la porción de fármaco del conjugado de molécula/fármaco objetivo para detectar los conjugados. Un agente enlazante al fármaco puede comprender un anticuerpo anti-fármaco, o fragmento enlazante al fármaco del mismo. Agentes enlazantes  
15 representativos adicionales incluyen, proteínas, péptidos, péptidos miméticos, ácidos nucleicos peptídicos (PNAS), ligandos, o cualquier otra molécula que se enlaza específicamente a una porción de fármaco como se describe en este documento.

20 Por ejemplo, el método puede comprender las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una superficie en la cual un primer complejo enlazante es inmovilizado, en donde el complejo enlazante comprende (i) un objetivo como se describe en este documento y (ii) un  
25 conjugado de molécula/fármaco objetivo unido al objetivo; (b)

contactar un anticuerpo anti-fármaco o fragmento enlazante al fármaco del mismo, con el primer complejo enlazante inmovilizado en la superficie del soporte sólido; y (c) detectar la formación de un segundo complejo enlazante de (i) 5 el anticuerpo anti-fármaco o fragmento enlazante al fármaco del mismo y (ii) el primer complejo enlazante en la superficie del soporte sólido, en donde la formación del complejo causa un cambio medible en la propiedad de masa del soporte sólido, indicando una cantidad de conjugado de 10 molécula/fármaco objetivo en la muestra.

Alternativamente, el método puede comprender las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una superficie a la cual un anticuerpo anti-fármaco o fragmento del mismo enlazante al fármaco se inmoviliza; (b) 15 poner en contacto una muestra que comprende conjugados molécula/fármaco objetivo con el anticuerpo anti-fármaco o fragmento enlazante al fármaco inmovilizado en la superficie del soporte sólido; y (c) detectar un cambio medible en propiedad de masa del soporte sólido que indica una cantidad 20 de conjugado molécula/fármaco objetivo en la muestra.

Un anticuerpo que se usa para detectar la porción de fármaco del conjugado molécula/fármaco objetivo puede ser cualquier anticuerpo que muestra enlace específico, es decir, enlace preferencial para el fármaco cuando el fármaco está 25 presente en una muestra que está en contacto con otros

antígenos. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. Anticuerpos anti-fármaco que tienen porcentajes bajos proporcionan la mayor sensibilidad. Cuando se usan anticuerpos anti-fármaco que tienen porcentajes moderados, se  
5 pueden usar correcciones de antecedentes para cuantificar conjugados de molécula/fármaco objetivo a sensibilidad reducida.

Son bien conocidos en la técnica métodos para preparar y caracterizar anticuerpos anti-fármaco. Véase, por  
10 ejemplo, Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Técnicas y reactivos adicionales útiles para generar y seleccionar una biblioteca que exhibe anticuerpo se pueden encontrar en, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,223,409 y Publicaciones de  
15 Solicitud Internacional PCT Nos. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690 y WO 90/02809.

Brevemente, se prepara un anticuerpo policlonal inmunizando un animal con un inmunógeno, que comprende un  
20 fármaco como se describe en este documento, y colectando antisuero del animal inmunizado. Se puede usar un intervalo amplio de especies animales para la producción de antisuero, por ejemplo, conejos, ratones, ratas, hámster, cobayos, cabras y burros.

25 En bien conocido en la técnica, el inmunógeno se

puede acoplar con un portador, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) y albúminas de suero (por ejemplo, BSA), para mejorar inmunogenicidad. Técnicas para conjugar un inmunógeno para un polipéptido portador son bien conocidas en la técnica e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoyl-N-hidroxysuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada. También se puede intensificar la inmunogenicidad de un inmunógeno por el uso de adyuvantes, por ejemplo, adyuvante de Freund completo, adyuvantes de Freund incompletos y adyuvante de hidróxido de aluminio.

La cantidad de inmunógeno usado para la producción de anticuerpos policlonales varía en la naturaleza del inmunógeno, el animal usado para inmunización, y la ruta de administración (por ejemplo, subcutáneo, intramuscular, intradérmica, intravenosa o intraperitoneal). La producción de anticuerpos policlonales se monitorea muestreando sangre del animal inmunizado en varios puntos después de la inmunización. Cuando se obtiene un titulador deseado del anticuerpo, el animal inmunizado se mezcla y el suero de aísla y almacena.

Un anticuerpo monoclonal anti-fármaco para uso en los métodos descritos puede ser fácilmente preparado a través del uso de técnicas bien conocidas tal como aquellos ejemplificados en la Patente Estadounidense No. 4,196,265. Por ejemplo, se inmunizan ratones o ratas con un fármaco por

un periodo suficiente para obtener una respuesta inmune, y después las células del bazo de animales inmunizados son después fusionadas con células de mieloma inmortal. Las células fusionadas se separan de la mezcla de células parentales no fusionadas, por ejemplo, por la adición de 5 agentes al medio de cultivo que bloquea la síntesis del nucléotido de novo (por ejemplo, aminopterina, metotrexato y azaserina). Se cultivan hibridomas individuales y se prueban los sobrenadantes para reactividad con el inmunógeno del 10 fármaco. Los clones seleccionados pueden ser indefinidamente propagados como una fuente del anticuerpo monoclonal.

Por medio de ejemplo específico, para producir un anticuerpo anti-fármaco como se describe en este documento, se inyectan ratones intraperitonealmente con entre 15 aproximadamente 1-200 µg de un antígeno que comprende un fármaco de un conjugado de molécula/fármaco objetivo. Se estimulan las células de linfocito B para hacer crecer por inyección el fármaco en asociación con un adyuvante tal como adyuvante de Freund completo. Como se necesite, los ratones 20 se refuerzan por inyección con una segunda dosis del fármaco mezclado con adyuvante de Freund incompleto. Unas pocas semanas después de la segunda inyección, los ratones siguen mezclando y el suero de titula por inmunoprecipitación. Las etapas de refuerzo y titulación se repiten hasta que se logra 25 un titulador adecuado. El bazo del ratón se remueve, los

29

linfocitos del bazo se aíslan y las células de mieloma se combinan con los linfocitos del bazo bajo condiciones apropiadas para fusión celular. Condiciones de fusión incluyen, por ejemplo, la presencia de polietilen glicol. Las células fusionadas se separan de células de mieloma no fusionadas, cultivando en una sección del medio tal como medio HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Se seleccionan los hibridomas resultantes para la producción de anticuerpos anti-fármaco. Se cultivan clones seleccionados en altos volúmenes para lograr cantidades adecuadas de anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser purificados por cromatografía de afinidad u otros métodos, como se conocen en la técnica.

#### EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se han incluido para ilustrar las formas de la invención. Se describen ciertos aspectos de los siguientes ejemplos en términos de técnicas y procedimientos encontrados o contemplados por los presentes co-inventores para trabajar bien en la práctica de la invención. Estos ejemplos ilustran prácticas de laboratorio estándar de los co-inventores. En vista de la presente descripción y el nivel general del experto en la técnica, aquellos de experiencia apreciarán que los siguientes ejemplos se planean para ser únicamente ejemplares y que se pueden emplear numerosos cambios, modificaciones y

alteraciones son apartarse del alcance de la invención.

#### EJEMPLO 1

##### Preparación de Conjugados Anticuerpo/Caliqueamicina

Ozogamicina gentuzumab y ozogamicina inotuzumab son  
5 conjugados de caliqueamicina de anticuerpos anti-CD33 y anti-  
CD22, hP67.6 y G5/44, respectivamente. Ozogamicina gentuzumab  
es el nombre genérico para el fármaco MYLOTARG®  
comercializado y también es referido como hP67.6-AcBut-  
CalichDMH. El conjugado anti-CD22/caliqueamicina, ozogamicina  
10 inotuzomab, también se conoce como G5/44-AcBut-CalichDMH,  
está actualmente en fase I de ensayos clínicos. Para obtener  
estos conjugados, hP67.6 y G5/44 se enlazan a N-acetil gamma  
caliqueamicina dimetil hidrazida con el enlazador ácido (4-  
(4' acetilfenoxi)butanoico (AcBut), ácido lábil. Se cargan  
15 anticuerpos a una densidad de aproximadamente 35 µg de  
caliqueamicina por mg de hP67.6 y aproximadamente 73 µg de  
caliqueamicina por mg de G5/44. Conjugados anti-Lewis  
Y/caliqueamicina y anti-5T4/caliqueamicina son similarmente  
preparados y se usan en los ensayos descritos.

20

#### EJEMPLO 2

##### Administración de Conjugados de Anticuerpo/Caliqueamicina

Se obtiene la línea celular Ramos (CRL-1923) de  
American Type Culture Collection (ATCC). Ramos es una CD22<sup>+</sup>,  
línea celular CD33<sup>-</sup> derivada de un linfoma de célula B  
25 humana. Las células se mantienen en cultivos en suspensión en

RPMI1640 suplementado con 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sodio, 0.2% (p/v) de glucosa, 100 U/ml de sodio de penicilina G, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina y 10% (v/v) de suero de bovino fetal.

5                    Se irradian ratones puros Balb/c de 16 semanas de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts) con 400 rad de rayos gamma. Se inyectan células Ramos ( $10^7/200$  µl) en el lado derecho de cada ratón. Después de 8 días, se seleccionan 10 ratones con un tamaño de tumor de  
10    aproximadamente  $0.5 \text{ cm}^3$  ( $\pm s=0.16$ ). Se crean cuatro grupos de tratamiento: (1) ratones que portan tumor tratados con hP67.6AcBut-CalichDMH, (2) ratones libres de tumor tratados con hP67.6-AcBut-CalichDMH, (3) ratones que portan tumor tratados con G5/44-AcBut-CalichDMH, y (4) ratones libre de  
15    tumor tratados con G5/44-AcBut-CalichDMH. Dos días antes de la administración de conjugados anticuerpo/caliqueamicina, se toman 5 µl de muestra sanguínea de cada ratón. Se inyecta una dosis única de 150 µl de conjugado anticuerpo/caliqueamicina (3 µg de caliqueamicina por ratón) en la vena de la cola  
20    lateral. Se toman muestras sanguíneas de exactamente 5 µl a 24, 48, 72 y 96 horas después de esto. Para obtener muestras de volumen pequeño reproducible, los ratones se mantienen bajo una lámpara de calefacción hasta que las venas de la cola llegan a ser visibles. La cola se desinfecta con alcohol  
25    isopropílico al 70%, y la vena lateral se perfora con una

aguja. La gota de sangre resultante después se aspira con un tubo capilar ensamblado a un micropipeteador (Drummond of Broomall, Pennsylvania) presente para aspirar un volumen de 5 µl. Esta muestra sanguínea es inmediatamente transferida a un tubo de prueba que contiene 195 µl de la siguiente mezcla: 0.01 M de HEPES (pH 7.4), 0.15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0.005% de Tensoactivo P20 (amortiguador HBS-EP, disponible de Biacore of Uppsala, Suecia).

### EJEMPLO 3

#### 10 Ensayo de Detección Intercalado de Resonancia de Plasmón

Se desarrolla el ensayo de detección intercalado de resonancia de plasmón para determinar en una muestra de suero (1) en una cantidad de molécula objetivo y conjugado molécula/fármaco objetivo en una muestra, y (2) una cantidad del fármaco presente en los conjugados molécula/fármaco objetivo de la misma muestra. El principio de este método se ilustra en la Figura 1. El ensayo permite una evaluación del espacio libre del conjugado molécula/fármaco objetivo. El método no discrimina entre una reducción del fármaco en todas las moléculas del conjugado y la generación de una fracción del anticuerpo conjugado.

Los análisis descritos en este documento se realizan en un Instrumento BIACORE® (Biacore International AB of Uppsala, Suecia) usando conjugados anticuerpo/caliqueamicina. El sistema de detección de este

instrumento depende de la medición de cambios de índice refractivo causados por la interacción de macromoléculas en chips biosensores. Véase por ejemplo, Johne et al., J. Immunol. Methods, 1993, 160(2):191-198; Karlson et al., J. Immunol. Methods, 1991, 145(1-2):229-240.

Se inmunizan antígenos para la superficie de un chip biosensor CM5 a una densidad de 4000-9000 unidades de resonancia/flujo celular. El chip se activa por el acoplamiento del reactivo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida-HCl/N-hidroxisuccinimida a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto por 6 minutos, seguido por la adición de antígenos. Se cargan antígenos Lewis-BSA, poniendo en contacto el chip con 50 µg/ml de proteína en una solución de 10 mM de acetato de sodio (pH 4.0-4.5) a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto por 6 minutos. CD33 o CD22Fc son covalentemente unidos a chips CM5, poniendo en contacto el chip a 0.1 mg/ml de proteína en una solución de 10 mM de acetato de sodio (pH 5) a una velocidad de flujo de 2 µl por minuto por 30 minutos. El chip después se lava con HBS-EP que contiene 300 mM de NaCl.

Después de la inmovilización del antígeno en un chip CM5, se establecen curvas de calibración para cada antígeno. Como un resultado representativo, las Figuras 2A-2B muestran la correlación entre la concentración de muestras estándar y el número de unidades de resonancia en el enlace

del conjugado hP67.6-AcBut-CalichDMH de anti-CD33/caliqueamicina. Un coeficiente de correlación de aproximadamente 1.0 permite determinación exacta de la cantidad total del anticuerpo y la cantidad de caliqueamicina unida al anticuerpo. Usando las curvas de calibración, se determina la concentración de suero de la porción de anticuerpo de un conjugado anticuerpo/fármaco.

Después de poner en contacto el chip con un anticuerpo anti-caliqueamicina, también se determina la cantidad de caliqueamicina presente en la muestra de suero. Como se demuestra por la ausencia de una segunda respuesta en la Figura 2B, el anticuerpo no conjugado en las mismas concentraciones no reacciona con el anticuerpo anti-caliqueamicina. Este resultado proporciona evidencia para la especificidad de la segunda respuesta por la presencia de caliqueamicina en el anticuerpo.

La respuesta después del enlace del conjugado a CD33 por si mismo (hP67.6-AcBut-CalichDMH) así como también seguido por una respuesta secundaria (hP67.6-AcBut-CalichDMH + anti-caliqueamicina) es lineal ( $r^2=0.9996$  y  $r^2=0.9994$ , respectivamente) para un intervalo de concentración del conjugado entre 0 y 500 ng/ml. La diferencia de estas respuestas (es decir, unidades de resonancia atribuibles al enlace de anti-caliqueamicina) también es lineal ( $r^2=0.9947$ ) dentro de este intervalo. Los coeficientes de regresión de

las ecuaciones cuadráticas de estas funciones son mayores que 0.99 cuando se usa un intervalo de concentración de 0 a 100 ng/ml. La interpolación usando una ecuación cuadrática de trazo de unidades de resonancia como una función de  
5 concentración permite la determinación exacta de concentración de conjugado anticuerpo/fármaco en una muestra que contiene entre 0 y 1000 ng/ml del conjugado de anticuerpo/fármaco.

Se usa una estrategia similar para establecer la  
10 descripción de curvas de calibración (1) la relación entre las unidades de resonancia y la concentración de anticuerpo anti-CD22 G5/44 y G5/44-AcBut-CalichDMH (véase Figura 4); y (2) la relación entre unidades de resonancia y la concentración de anticuerpo anti-Lewis Y G193 y CMD193, un  
15 conjugado del mismo de caliqueamicina. Estas relaciones también son mejor descritas ( $r^2 > 0.99$ ) por una ecuación cuadrática para un intervalo de concentración entre 0 y 1000 ng/ml.

#### EJEMPLO 4

##### 20 Propiedades Farmacocinéticas de Conjugados Anti- CD33/Caliqueamicina

Las propiedades farmacocinéticas de hP67.6-AcBut-CalichDMH se determinan en ratones que portan tumor y libres de tumor. Se usan cinco animales para cada grupo. Los ratones  
25 que portan tumor tienen un peso corporal promedio de 19 g

(desviación estándar = 1 g) y tiene tumores Ramos de injerto heterólogo con un volumen promedio de 528 mm<sup>3</sup> (desviación estándar 102 mm<sup>3</sup>), los ratones libres de tumor tienen un peso corporal promedio de 20 g (desviación estándar = 1 g).

5           La figura 3A muestra la concentración de hP67.6-AcBut-CalichDMH en plasma de ratones puros en varios puntos de tiempo después de la inyección intravenosa de una dosis única de conjugado anticuerpo/fármaco. Se administra una dosis de 3 µg de caliqueamicina a cada ratón. La dosis de  
10 anticuerpo se indica como µg/kg de masa corporal. Se calcula la concentración del conjugado anticuerpo/fármaco en plasma corrigiendo un hematocrito normal de 45%, y se asume que no se enlaza el conjugado anticuerpo/fármaco a la fracción celular. Se administra una dosis de 3 µg de caliqueamicina,  
15 la cual se proporciona como 86 µg del conjugado anticuerpo/fármaco que tiene 35 µg de caliqueamicina por mg de anticuerpo en un volumen sanguíneo de 1.5 ml (volumen sanguíneo aproximado de un ratón de 20 g). Por lo tanto, se anticipa teóricamente 105 µg/ml como una concentración  
20 máxima. En base a un volumen de muestra sanguínea de 5 µl, concentraciones experimentalmente determinadas de conjugado anticuerpo/fármaco después de 20 minutos es aproximadamente 80 µg/ml.

          Las cantidades de conjugado anticuerpo/fármaco que  
25 se administran a cada ratón varía dependiendo de la masa

corporal actual del animal. Dentro de un intervalo de 4.1 a 4.5 mg de conjugado anticuerpo/fármaco por kg, la dosis administrada no es directamente proporcional a la concentración máxima del conjugado en plasma. Además, los  
5 datos no indican que la variación de dosis es responsable para variaciones en vida media de circulación. Se observa una vida media de circulación excepcionalmente alta en un ratón único que ha recibido una dosis de 5 mg de conjugado anticuerpo/fármaco por kg.

10 La cantidad de hP67.6 conjugado a caliqueamicina tiene una vida media de circulación más corta que el anticuerpo no conjugado. Esto se ilustra en la Figura 3C, la cual muestra una concentración consistentemente en  
15 disminución de caliqueamicina conjugada (respuesta 2) como una fracción de la porción del anticuerpo de hP67.6-AcBut-CalichDMH (respuesta 1). La reducción reproducible de caliqueamicina total enlaza al anticuerpo no es influenciada por la presencia del tumor Ramos CD22<sup>+</sup>.

#### EJEMPLO 5

20 Propiedades Farmacocinéticas de Conjugados Anti-  
CD22/Caliqueamicina

Las propiedades farmacocinéticas de G5/44-AcBut-CalichDMH se determinan en ratones que portan tumor y libres de tumor. Tres ratones que portan tumor tienen un peso  
25 corporal promedio de 19 g (desviación estándar = 1 g) y

tienen tumores Ramos de injerto heterólogo con un volumen promedio de  $1276 \text{ mm}^3$  (desviación estándar  $398 \text{ mm}^3$ ). Seis ratones libres de tumor tienen un peso corporal promedio de 20 g (desviación estándar = 1 g). Se realiza la  
5 administración de conjugados anti-CD22/caliqueamicina y el ensayo de resonancia de plasmón de superficie como se describe en los Ejemplos 2, 3 y 4.

Las curvas de calibración describen la relación entre las unidades de resonancia y la concentración del  
10 anticuerpo G5/44 y conjugado G5/44-AcBut-CalichDMH se muestra en la Figura 4. La relación es mejor descrita ( $r > 0.99$ ) por una ecuación cuadrática para un intervalo de concentración entre 0 y 1000 ng/ml. Véase la figura 4. Como para hP67.6 no conjugado, no se observa una respuesta para caliqueamicina  
15 libre con G5/44 no conjugado.

La figura 5A muestra la disminución de concentración de la porción del anticuerpo de G5/44-AcBut-CalichDMH en plasma de ratones que portan tumor y que no portan tumor. Las concentraciones de la porción de anticuerpo  
20 de G5/44-AcBut-CalichDMH (Figura 5A) y de la cantidad de caliqueamicina enlazada a G5/44 (Figura 5B) disminuye más rápido en ratones que portan tumor. Esto se refleja en la vida media de circulación disminuida de G5/44-AcBut-CalichDMH. Véase Tabla I. La presencia de un tumor que  
25 expresa el CD22 objetivo intensifica la remoción del

conjugado del plasma. La disminución de la concentración de caliqueamicina como una función de tiempo es idéntica en ratones que portan tumor y que no portan tumor (Figura 5C), indicando que la presencia del tumor no influye en la liberación de caliqueamicina de la porción de anticuerpo del conjugado.

Tabla I

10

15

|  |                | -tumor          | +tumor          |
|--|----------------|-----------------|-----------------|
|  | <sup>2</sup> T | 55 ± 18*        | 39 ± 21         |
|  | AUC            | 2,251 ± 406     | 997 ± 241       |
|  | CL             | 0.0012 ± 0.0002 | 0.0025 ± 0.0007 |
|  | Vss            | 5 ± 2           | 7 ± 4           |
|  | <sup>2</sup> T | 29 ± 5.8        | 22.4 ± 6.3      |
|  | AUC            | 1,236 ± 233     | 681 ± 164       |
|  | CL             | 0.002 ± 0.000   | 0.004 ± 0.001   |
|  | Vss            | 4.6 ± 1.2       | 5.2 ± 0.9       |

20

25

AB = porción de anticuerpo, CM = caliqueamicina enlazada al anticuerpo, <sup>2</sup>T = vida media del plasma (h), AUC = área bajo la curva (h\*µg/ml), CL = espacio en blanco (ml/min/kg), Vss = distribución de volumen (ml/kg).

### REIVINDICACIONES

Método para determinar una cantidad de molécula objetivo y una cantidad de conjugado de molécula/fármaco objetivo en una muestra, caracterizado porque comprende las etapas de:

(a) proporcionar un soporte sólido que comprende una superficie en la cual un objetivo es inmovilizado;

(b) proporcionar una muestra que comprende una pluralidad de conjugados de molécula/fármaco objetivos;

(c) contactar la muestra con el objetivo inmovilizado a la superficie del soporte sólido;

(d) detectar la formación en la superficie del soporte sólido de un primer complejo enlazante de (i) la molécula objetivo y (ii) el objetivo en la superficie del soporte sólido, en donde la formación del primer complejo enlazante causa un primer cambio medible en la propiedad de masa del soporte sólido, indicando una cantidad de molécula objetivo en la muestra;

(e) contactar el primer complejo enlazante con un agente enlazante al fármaco que enlaza específicamente el fármaco del conjugado de molécula/fármaco objetivo; y

(f) detectar la formación en la superficie del soporte sólido de un segundo complejo enlazante de (i) el agente enlazante al fármaco y (ii) el primer complejo enlazante, en donde la formación del segundo complejo

enlazante causa un segundo cambio medible en la propiedad de masa del soporte sólido, indicando una cantidad de conjugado de molécula/fármaco objetivo en la muestra.

1. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el objetivo es expresado en células cancerígenas o en células involucradas en una respuesta autoinmune.

2. Método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el objetivo expresado en células cancerígenas es 5T4, CD19, CD20, CD22, CD33, Lewis Y, HER-2, receptor Fc tipo I para inmunoglobulina G (Gc gamma RI), CD52, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), complejo de ADN/histona, antígeno carcinoembriónico (CEA), CD47, VEGFR2 (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular o receptor que contiene el dominio de inserto cinasa, KDR), molécula de adhesión de células epiteliales (Ep-CAM), proteína de activación del fibroblasto (FAP), receptor-1 Trail (DR4), receptor de progesterona, antígeno oncofetal CA19.9 o fibrina.

3. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula objetivo es un anticuerpo.

4. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el fármaco es caliqueamicina.

5. Método de conformidad con la reivindicación 1,

caracterizado porque el agente enlazante al fármaco es un anticuerpo.

6. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra comprende un volumen de  
5 aproximadamente 5  $\mu$ l o menos.

7. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra es una muestra de sangre.

8. Método para determinar una cantidad de conjugado de molécula/fármaco objetivo en una muestra,  
10 caracterizado porque comprende las etapas de:

(a) proporcionar un soporte sólido que comprende una superficie en la cual, un primer complejo enlazante es inmovilizado, en donde el complejo enlazante comprende (i) un objetivo y (ii) un conjugado de molécula/fármaco objetivo  
15 unido al objetivo;

(b) contactar un agente enlazante al fármaco que específicamente enlaza el fármaco del conjugado de molécula/fármaco objetivo con el primer complejo enlazante inmovilizado en la superficie del soporte sólido; y

20 (c) detectar la formación de un segundo complejo enlazante de (i) el agente enlazante al fármaco y (ii) el primer complejo enlazante en la superficie del soporte sólido, en donde la formación del complejo causa un cambio medible en la propiedad de masa del soporte sólido, indicando  
25 una cantidad de conjugado de molécula/fármaco objetivo en la

muestra.

10. Método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el objetivo es expresado en células cancerígenas o en células involucradas en una respuesta  
5 autoinmune.

11. Método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el objetivo expresado en células cancerígenas es 5T4, CD19, CD20, CD22, CD33, Lewis Y, HER-2, receptor Fc tipo I para inmunoglobulina G (Gc gamma RI),  
10 CD52, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), complejo de ADN/histona, antígeno carcinoembriónico (CEA), CD47, VEGFR2 (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular o receptor que contiene el dominio de inserto cinasa, KDR),  
15 molécula de adhesión de células epiteliales (Ep-CAM), proteína de activación del fibroblasto (FAP), receptor-1 Trail (DR4), receptor de progesterona, antígeno oncofetal CA19.9 o fibrina.

12. Método de conformidad con la reivindicación 9,  
20 caracterizado porque la molécula objetivo es un anticuerpo.

13. Método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el fármaco es caliqueamicina.

14. Método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el agente enlazante al fármaco es un  
25 anticuerpo.

15. Método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque la muestra comprende un volumen de aproximadamente 5  $\mu$ l o menos.

16. Método de conformidad con la reivindicación 9,  
5 caracterizado porque la muestra es una muestra de sangre.

17. Método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque la cantidad de molécula objetivo en la muestra es determinada midiendo un cambio en la propiedad de masa de un soporte sólido después del enlace de conjugados de  
10 molécula/fármaco objetivos a un objetivo inmovilizado en una superficie de un soporte sólido.

18. Método para determinar una cantidad promedio de carga de fármaco por molécula objetivo en una muestra de conjugados de molécula/fármacos objetivos, caracterizado  
15 porque comprende las etapas de:

(a) proporcionar un soporte sólido en el cual, los  
conjugados de molécula/fármaco objetivo de una muestra están  
unidos;

(b) determinar una cantidad de fármaco en la  
20 muestra midiendo un cambio en la propiedad de masa de un soporte sólido después del enlace de un agente enlazante al fármaco, el cual específicamente, enlaza el fármaco del conjugado de molécula/fármaco objetivo, a los conjugados de molécula/fármaco objetivo en la superficie del soporte  
25 sólido; y

(c) calcular una cantidad promedio de fármaco por conjugado de fármaco/molécula objetivo dividiendo la cantidad de fármaco de (b) por una cantidad de molécula objetivo en la muestra.

5           19. Método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el objetivo es expresado en células cancerígenas o en células involucradas en una respuesta autoinmune.

10           20. Método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el objetivo expresado en células cancerígenas es 5T4, CD19, CD20, CD22, CD33, Lewis Y, HER-2, receptor Fc tipo I para inmunoglobulina G (Gc gamma RI), CD52, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), complejo de 15 ADN/histona, antígeno carcinoembrionario (CEA), CD47, VEGFR2 (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular o receptor que contiene el dominio de inserto cinasa, KDR), molécula de adhesión de células epiteliales (Ep-CAM), proteína de activación del fibroblasto (FAP), receptor-1 20 Trail (DR4), receptor de progesterona, antígeno oncofetal CA19.9 o fibrina.

          21. Método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la molécula objetivo es un anticuerpo.

25           22. Método de conformidad con la reivindicación

18, caracterizado porque el fármaco es caliqueamicina.

23. Método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el agente enlazante al fármaco es un anticuerpo.

5           24. Método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la muestra comprende un volumen de aproximadamente 5 µl o menos.

25. Método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la muestra es una muestra de sangre.

10           26. Método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la cantidad de molécula objetivo en la muestra es determinada midiendo un cambio en la propiedad de masa de un soporte sólido después del enlace de los conjugados de molécula/fármaco a un objetivo inmovilizado en  
15 una superficie de un soporte sólido.

20

25

FIG. 1

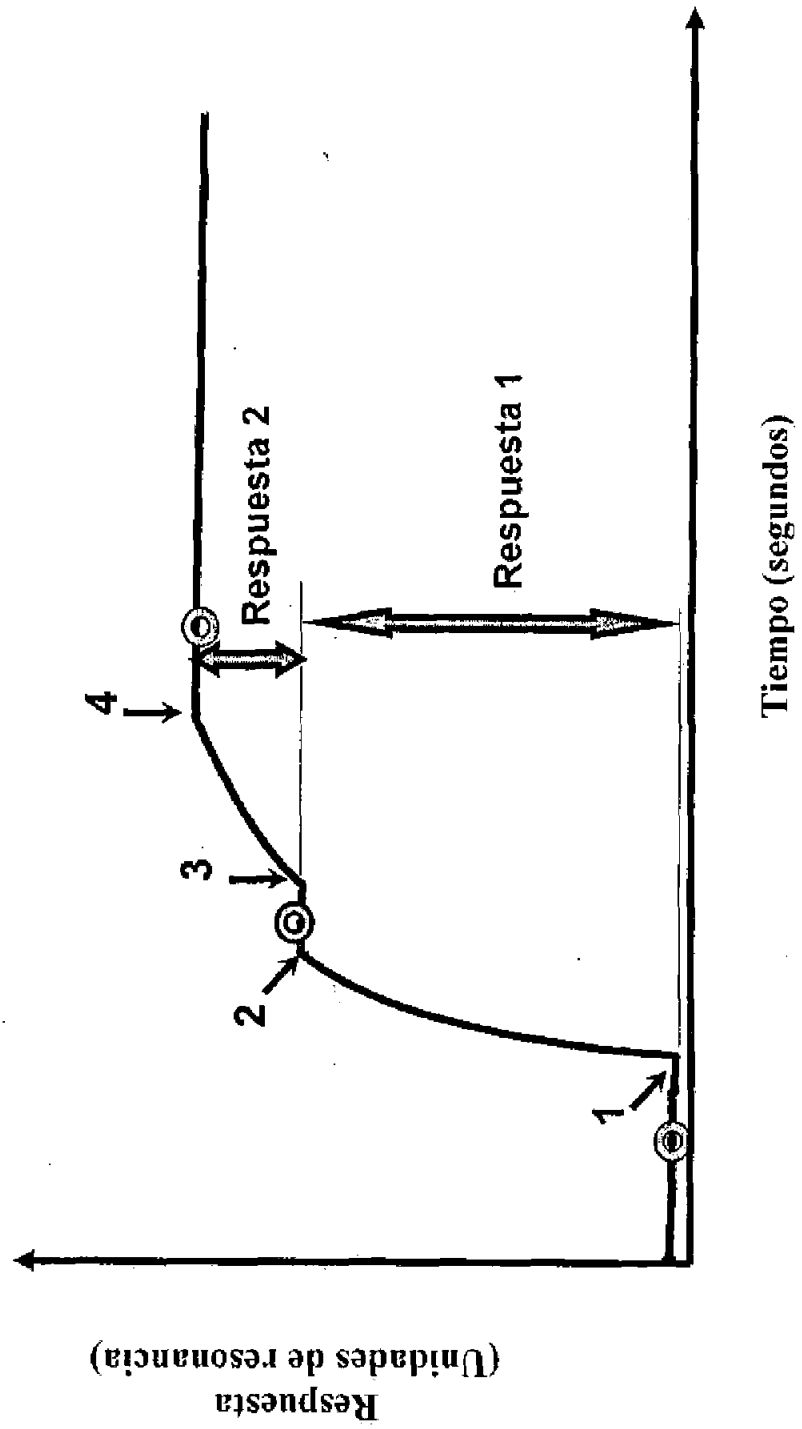


FIG. 2A

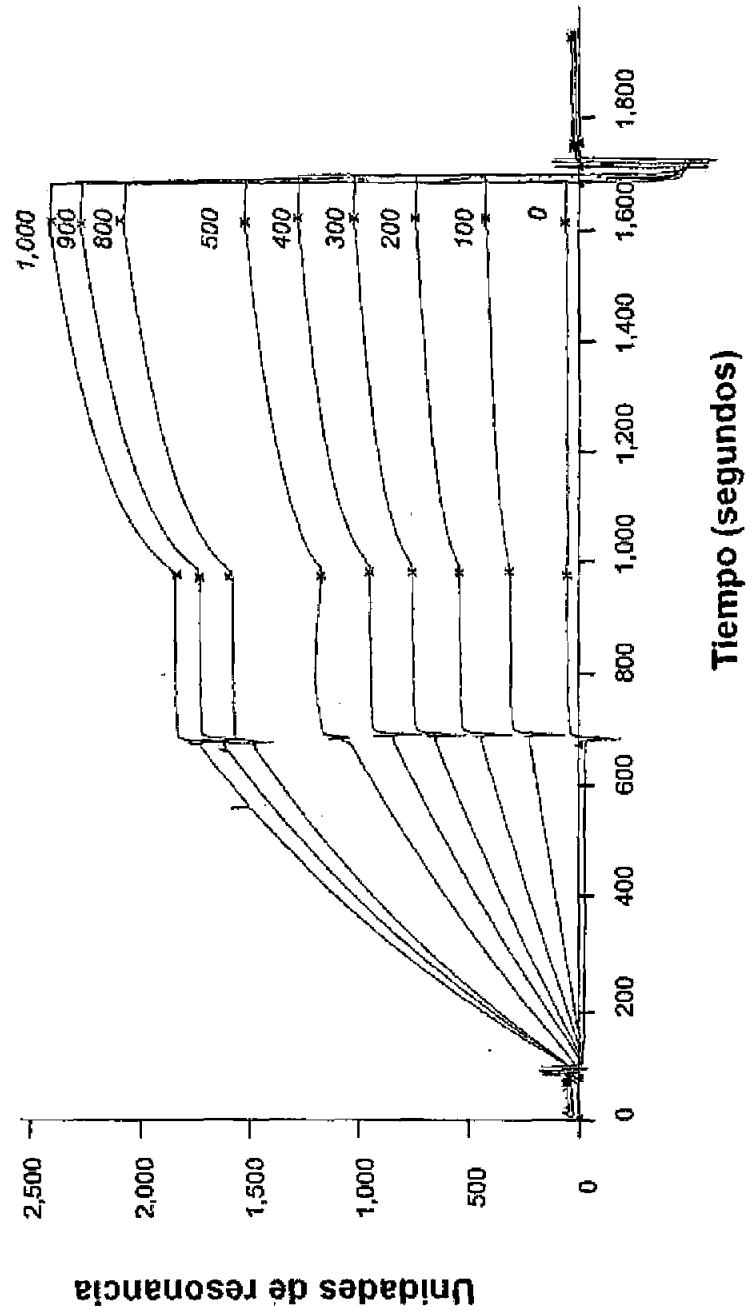


FIG. 2B

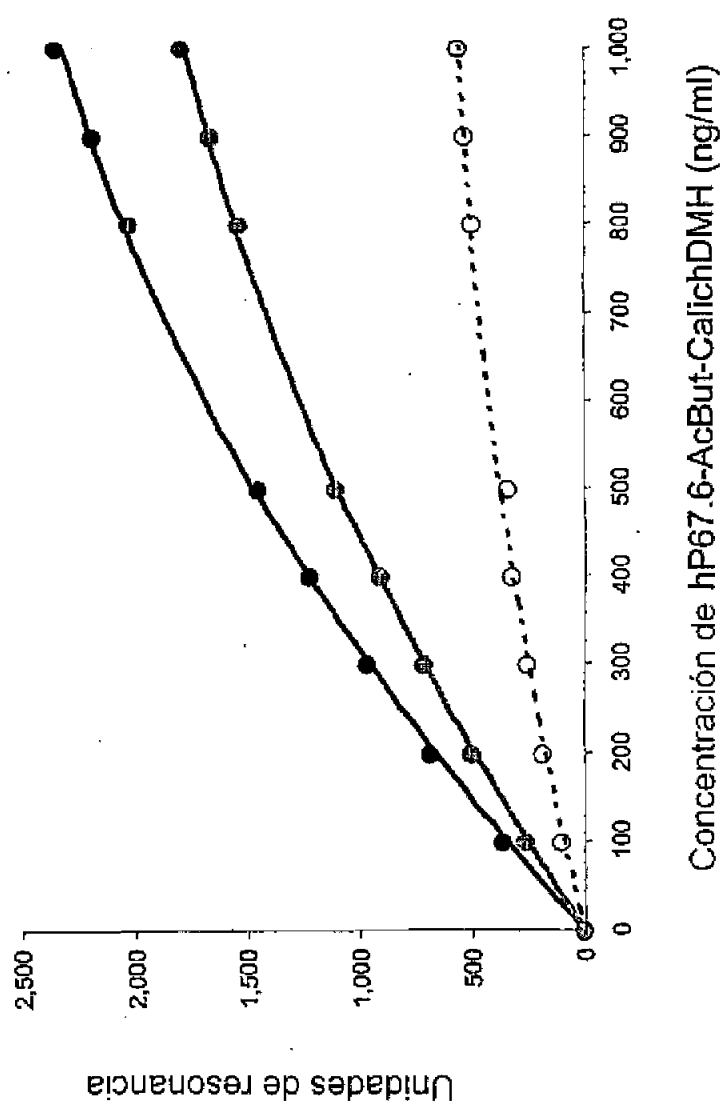


FIG. 3A

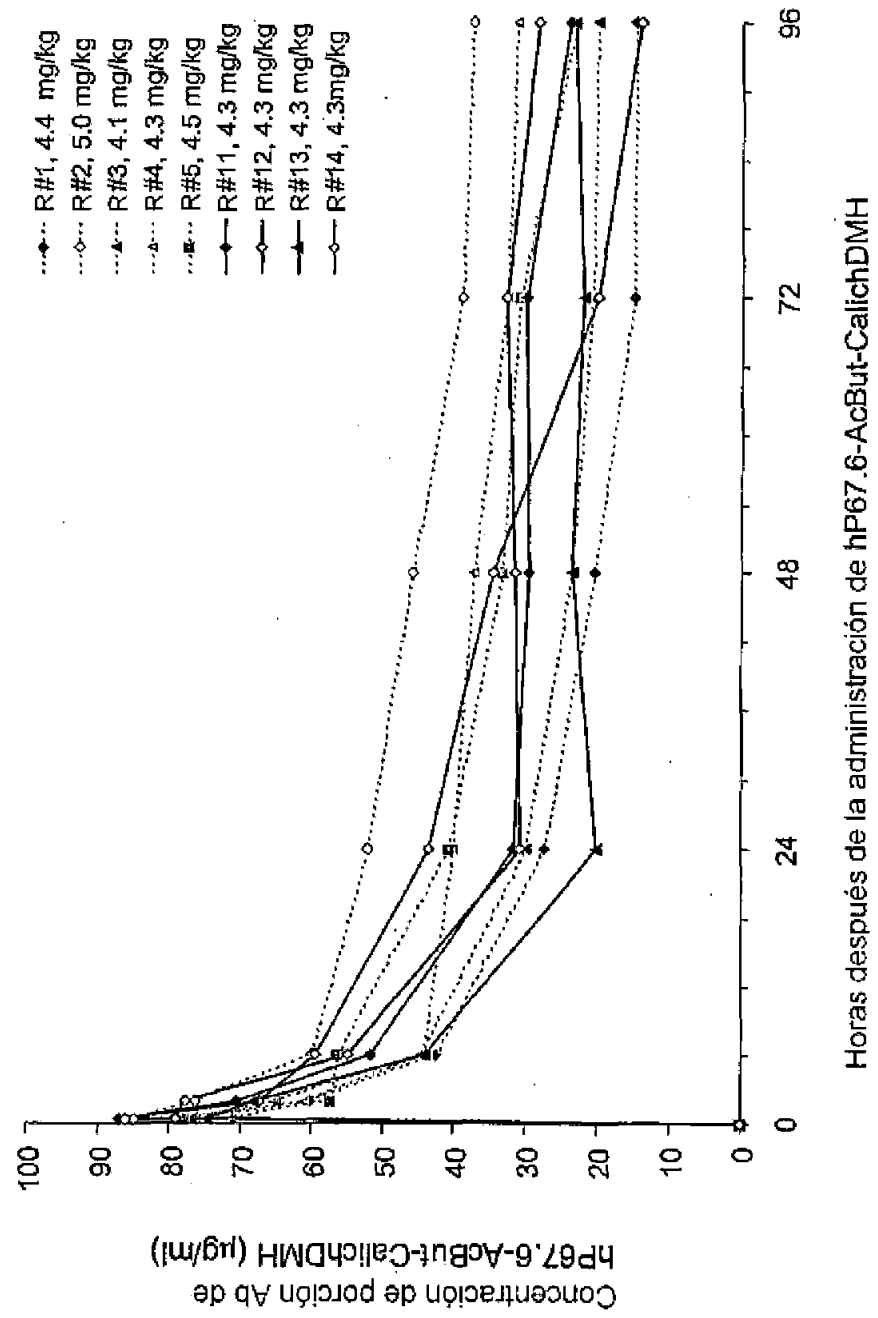


FIG. 3B

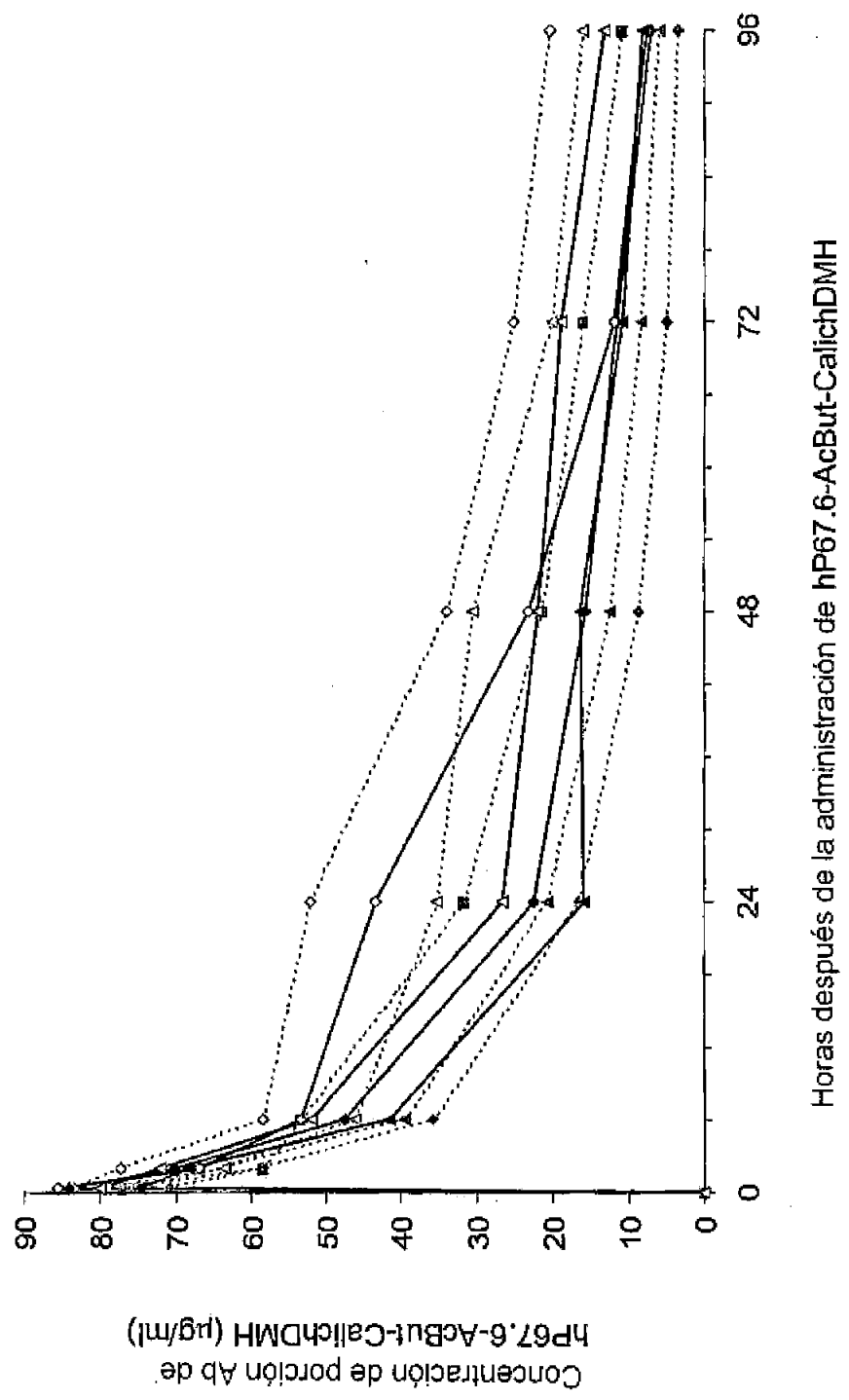


FIG. 3C

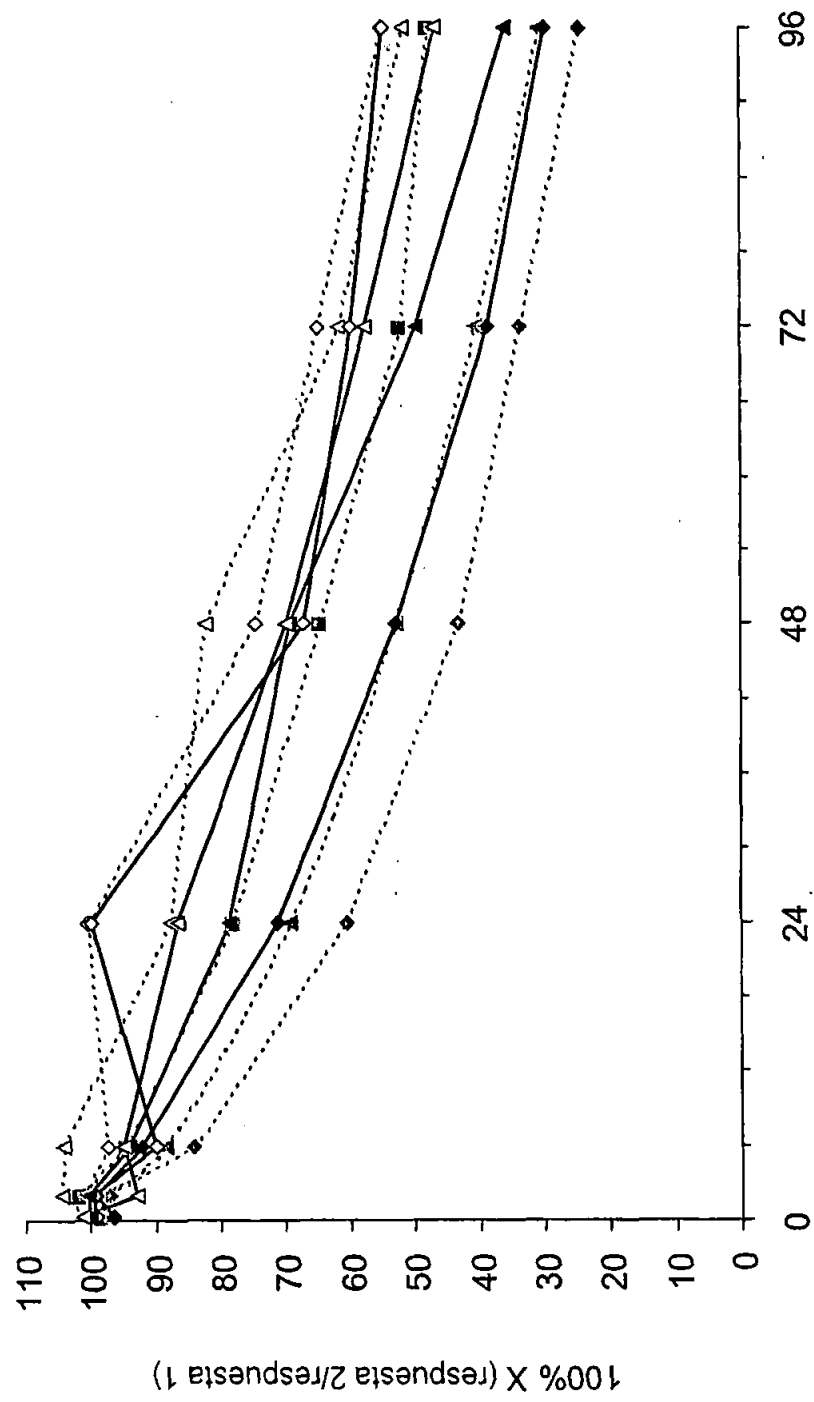


FIG. 4

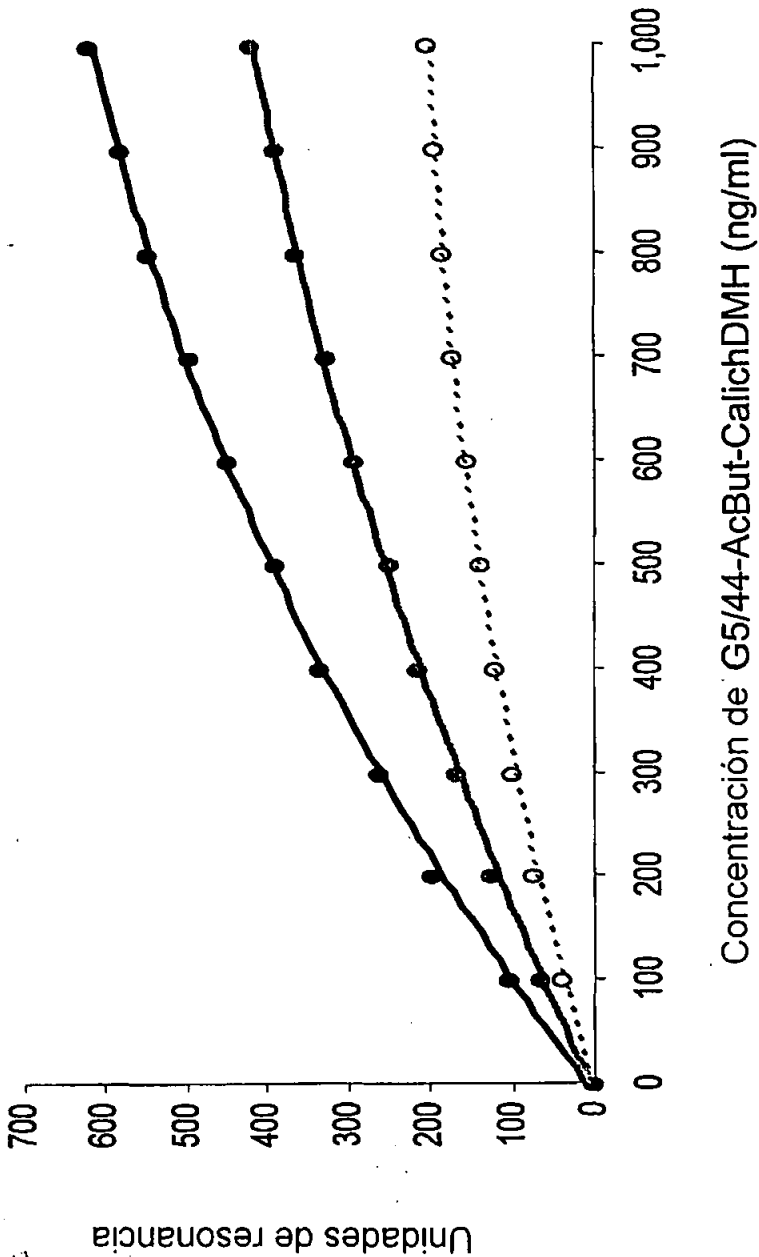


FIG. 5A

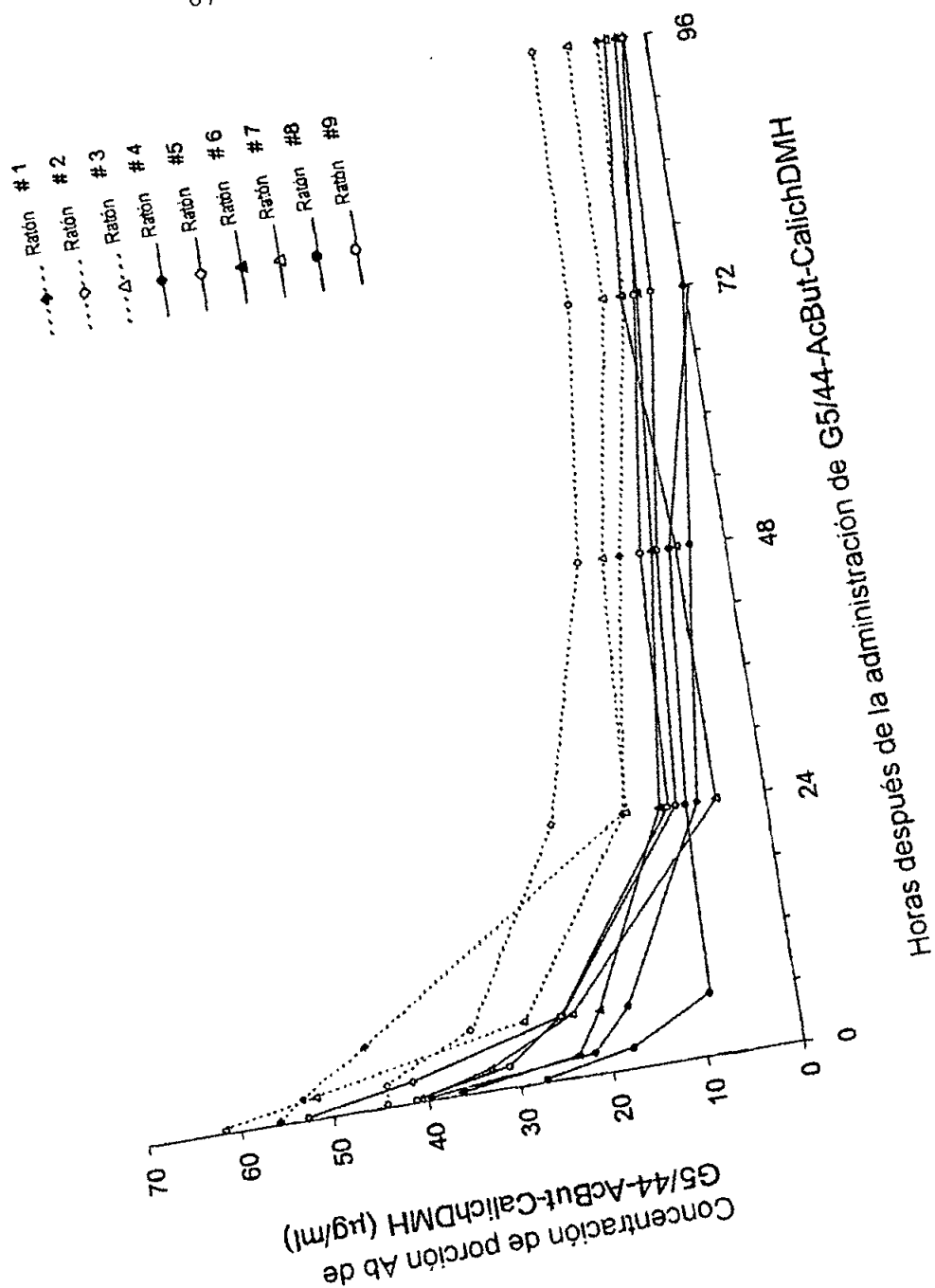


FIG. 5B

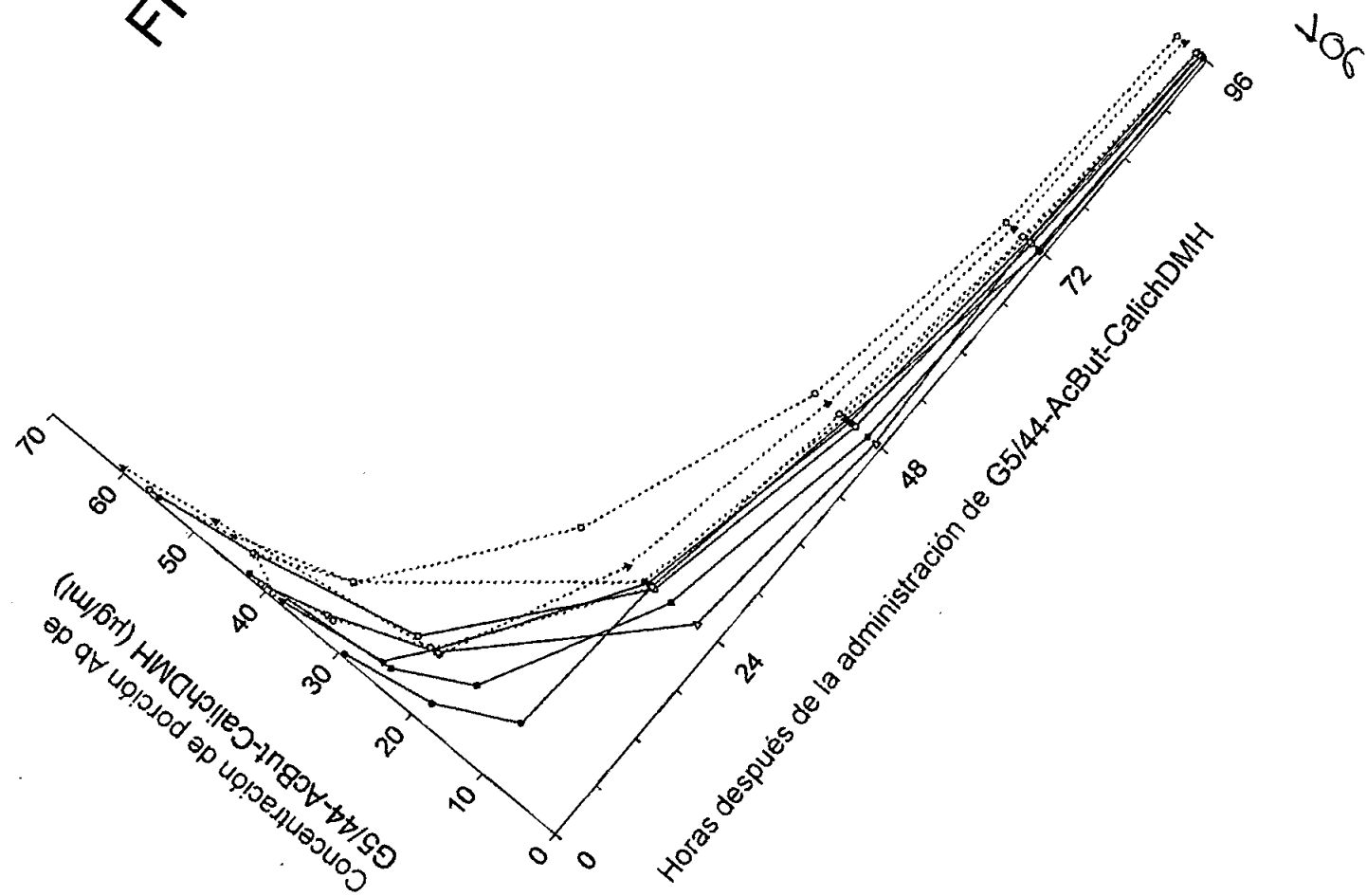
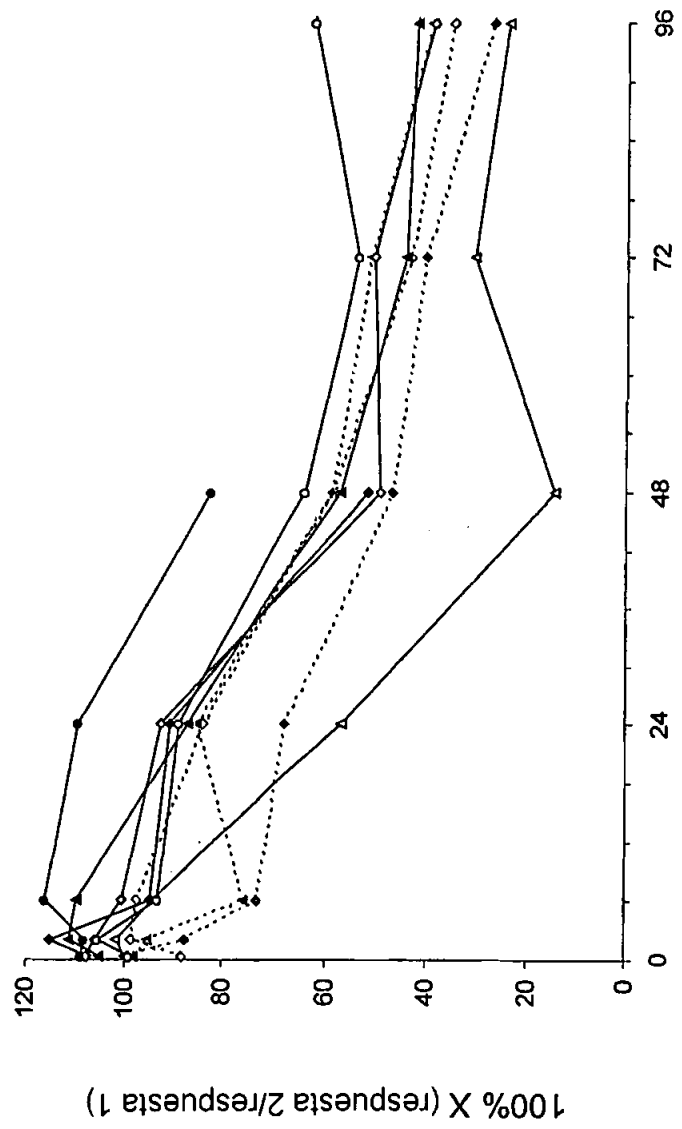


FIG. 5C



Horas después de la administración de G5/44-AcBut-CalichDMH

**Respuesta al punto III**

**Sin establecimiento de la opinión con respecto a la novedad,  
etapa inventiva y aplicabilidad industrial**

1. Las presentes reivindicaciones 1, 9 y 18, se refieren a métodos para usar ciertos compuestos, en donde dichos compuestos han sido definidos por una propiedad deseada o efecto, es decir, "molécula objetivo", o "agente enlazante al fármaco". Sin embargo, la descripción no proporciona soporte y descripción en el sentido del Artículo 6 del PCT por cualquiera de tales compuestos que tienen dicha propiedad o efecto y no existe un conocimiento general común de este tipo disponible para la persona experta en la técnica. Este no acatamiento con las provisiones sustantivas es a tal magnitud, que la búsqueda se realiza tomando en consideración el no acatamiento en la determinación de la extensión de la búsqueda de la reivindicación (Líneas Guías del PCT 9.19 y 9.20).

La búsqueda de las reivindicaciones 1, 9 y 18, fue consecuentemente restringida a los compuestos específicamente descritos que tienen la propiedad o efecto deseado, véase ejemplos de la descripción 1-5 y el concepto amplio de compuesto que tiene la propiedad o efecto deseado, es decir, a "moléculas objetivo", las cuales son anticuerpos a los

"agentes enlazantes al fármaco", los cuales son anticuerpos.

2. Las presentes reivindicaciones 1, 9 y 18, se refieren a métodos, en donde una cierta propiedad del soporte sólido es medida, es decir, un cambio en la propiedad de masa. Sin embargo, la descripción no proporciona soporte y descripción en el sentido del Artículo 6 y 5 del PCT por cualquier cambio en la propiedad de masa y no existe un conocimiento general común de este tipo disponible para la persona experta en la técnica. Este no acatamiento con las provisiones sustantivas es a tal magnitud, que la búsqueda se realizó tomando en consideración el no acatamiento en la determinación de la extensión de la búsqueda de la reivindicación (Líneas guías del PCT 9.19 y 9.20).

La búsqueda de las reivindicaciones 1, 9 y 18 fue consecuentemente restringida a los métodos específicamente descritos en donde el cambio en la propiedad de masa es medido por resonancia de plasmón, véase la descripción p. 2, 1. 10 y ejemplos 1-5.

Respuesta Punto V

**Declaración razonada con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan tal declaración**

3. Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: WO 03/005890 A2 (UNIV ARIZONA [US]; BEAUDOIN STEPHEN P [US]; BOOKSH KARL S [US]; KHAIRA) 23 Enero 2003 (2003-01-23).

D2: WO 03/092623 A2 (WYETH CORP [US]; KUNZ ARTHUR [US]; MORAN JUSTIN KEITH [US]; RUBINO JOS) 13 Noviembre 2003 (2003-11-13).

D3: BOGHAERT E R ET AL: "ANTIBODY - TARGETED CHEMOTHERAPY WITH THE CALICHEAMICIN CONJUGATE HU3S193-N-ACETYL GAMMA CALICHEAMICIN DIMETHYL HYDRAZIDE TARGETS LEWISY AND ELIMINATES LEWSIY - POSITIVE HUMAN CARCINOMA CELLS AND XENOGRAFTS" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; US Vol.10, no.13, Julio 1 2004 (2004-07-01), páginas 4538 - 4549, XP008060140 ISSN:1078-0432.

D4: JOHNE B ET AL: "Epitope mapping and Binding kinetics of monoclonal antibodies studied by real time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance". JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, 2 Abril 1993,

Forma PCT/ISA/237 (Hoja separada) (Hoja 3) (EPO-Abril 2005)

Vol.160, no. 2, 2 Abril 1993 (1993-04-02), Páginas 191 - 198  
XP002405676 ISSN:0022-1759

D5: VAREIRO MARGARIDA M L M ET AL: " Surface Plasmon fluorescence measurement of human Chorionic gonadotrophin: role of antibody Orientation in obtaining enhanced Sensitivity and 'limit of detection" ANALYTICAL CHEMISTRY. 15 Abril 2005 Vol. 77, no.8 Abril 15 2005 (2005-04-15), Páginas 2426 - 2431, XP002405677 ISSN: 0003-2700.

D6: DIJOSEPH J F ET AL: "Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of b-lymphoid malignancies" BLOOD, vol.103, no. 5, Marzo 2004(2004-03), Páginas 1807 - 1814, XP0008060153 ISSN:0006-4971.

#### 4. Novedad (Art. 33(2) del PCT)

El documento D4 describe en la Figura 2(a), un ensayo de intercalación de mioglobina siguiendo la secuencia RAM-Fc+ Mab inferior + mioglobina + Mab superior. Se puede ver que después del enlace de mioglobina a Mab inferior, se forma un complejo que comprende el Mab inferior y mioglobina, el cual podría ser considerado como el conjugado de molécula/fármaco objetivo actual. La cantidad de fármaco (mioglobulina) unido es determinada por el enlace del Mab superior. Se nota que la naturaleza de la interacción (covalente o no covalente) de la molécula objetivo y el

fármaco no es establecida en las reivindicaciones. De este modo, las reivindicaciones 4, 6-8, 12, 14, 15, 17, 18, 21, 23, 24, 26, no son nuevas.

El documento D5 describe un método para medir el enlace de ciertos compuestos por resonancia de plasmón. En la ausencia de una mejor definición para el fármaco en las reivindicaciones, el conjugado de anticuerpo-fármaco, podría ser cualquiera de los fragmentos monobiotinilados Fab-hCG de la Figura 2 (ii). En la Figura 2 (ii), el hCG podría ser el fármaco. De este modo, en la Figura 2(ii), el anticuerpo biotinilado está unido a su objetivo (estreptavidina) y el fármaco (hCG) se encuentra con su agente enlazante al fármaco (anticuerpo anti-hCG). De este modo, las reivindicaciones 1, 4, 6-8, 12, 14, 15, 17, 18, 21, 23, 24, 26, no son nuevas.

Se debe tomar en cuenta también, que la novedad de los métodos de las reivindicaciones 1, 8 y 19, sin la limitación expuesta en el punto III anterior, podría ser destruida también por el método de la Figura 2(i), puesto que existe libertad para seleccionar lo que es el objetivo, molécula objetivo y fármaco. De este modo, el anticuerpo biotinilado aleatoriamente, podría ser el complejo de molécula/fármaco objetivo, en donde la molécula objetivo es biotina y el fármaco es el anticuerpo, el objetivo podría ser

estreptavidina y el agente enlazante al fármaco es hCG.

De otro modo, los métodos limitados de conformidad con el punto III anterior, son nuevos sobre los documentos D1-D3 y D6:

El documento D1, en donde la resonancia de plasmón es usada para determinar el enlace de mioglobina a anticuerpo anti-mioglobina inmovilizada (ejemplos 1 y 2), no usa un agente enlazante al fármaco adicional para determinar la cantidad de fármaco unido (anticuerpo anti-mioglobina).

El documento D2, en donde los análisis de enlace de CMC-544 al fragmento CD22mFc inmovilizado, fueron realizados usando resonancia de plasmón (ejemplo 5), no usa un agente enlazante al fármaco adicional (anticuerpo anti-caliqueamicina) para determinar la cantidad de fármaco unido.

El documento D3, en donde los análisis de enlace de hu3S193-calichDMH al antígeno inmovilizado, fueron realizados usando resonancia de plasmón (Figura 2), no usa un agente enlazante al fármaco adicional (anticuerpo anti-caliqueamicina) para determinar la cantidad de fármaco unido.

El documento D6 describe la determinación de las farmacocinéticas de CMC-544 por un ensayo ELISA.

##### 5. Etapa inventiva (Art. 33(3) del PCT

El documento D6 es considerado como la técnica

anterior más cercana. Proporciona un método para determinar las farmacocinéticas de CMC-544 en un ensayo ELISA.

La presente solicitud usa una técnica diferente.

El problema técnico es considerado como la provisión de métodos alternativos para determinar las farmacocinéticas de terapias de suministro de fármacos.

La presente solución de las reivindicaciones 1-26, resuelve el problema pero no de una manera inventiva.

La resonancia de plasmón es una técnica bien conocida que puede ser usada para determinar el enlace de dos especies, tales como enlace de anticuerpo/antígeno (documento D1-D5). El documento D1, además dice que los métodos de Elisa intercalados pueden ser empleados sin usar moléculas etiquetadas. De este modo, la persona experta que desea proporcionar alternativas a los métodos del documento D6, podría también pensar en usar la resonancia de plasmón en lugar de los métodos de Elisa con las moléculas etiquetadas. Podría hacerse así debido a que parece ser más una forma más fácil y más rápida que los métodos de ELISA estándares, conforme no se requieren compuestos etiquetados. Sin embargo, la persona experta tiene del documento D6, todas las necesidades para realizar el método usando resonancia de plasmón. De este modo, se proporcionan el objetivo (Cd22mFc), el conjugado (CMC-544) y el agente enlazante al fármaco

(anticuerpo anticaliqueamicina). Por lo tanto, la materia objeto de las reivindicaciones 1-26 no es inventiva sobre la combinación de los documentos D1 y D6.

Lo mismo es aplicable a la combinación de los documentos D6 y D2 ó D3. En este caso, los documentos D2 ó D3 han proporcionado ya un ensayo de enlace de conjugados de anticuerpo-caliqueamicina a sus objetivos usando resonancia de plasmón. De este modo, la determinación de las farmacocinéticas de conjugados de anticuerpo-caliqueamicina del documento D6 usando resonancia de plasmón, podría ser obvia a la persona experta, quien solamente necesita agregar el anticuerpo anticaliqueamicina proporcionado en el documento D6 a los ensayos de los documentos D2 ó D3. Podría así hacerlo debido a que es otra forma de proporcionar métodos alternativos para determinar las farmacocinéticas de terapias de suministro de fármaco en una forma más fácil que en el documento D6, puesto que no se requiere etiqueta. De este modo, las reivindicaciones 1-26 no son inventivas.

#### 6. Aplicabilidad industrial (Art. 33(4) del PCT)

La materia objeto de las reivindicaciones 1-26, cubre los requerimientos del Art. 33(4) del PCT.

**Respuesta al Punto VII**

**Ciertos defectos en la solicitud internacional**

7. Contrario a los requerimientos de la Regla 5.1(a)(ii) del PCT, el antecedente relevante de la técnica descrito en los documentos D1-D5, no es mencionado en la descripción, ni están estos documentos identificados aquí.

**Repuesta al Punto VIII**

**Ciertas observaciones en la solicitud internacional**

8. La declaración vaga e imprecisa en la descripción en la página 1, párrafo 1 y p. 19, párrafo 2, implica que la materia objeto para la cual se busca la protección puede ser diferente de aquella definida por las reivindicaciones, con ello resultando en una carencia de claridad (Artículo 6 del PCT), cuando se usa para interpretarlas.

9. El solicitante podría ser requerido para suprimir la expresión "incorporado por referencia" durante la fase regional.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/025736

117

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/543 G01N21/55

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | WO 03/005890 A2 (UNIV ARIZONA [US];<br>BEAUDOIN STEPHEN P [US]; BOOKSH KARL S<br>[US]; KHAIRA) 23 January 2003 (2003-01-23)<br>Abstract; p.18, l. 28-30. | 1-26                  |
| Y         | WO 03/092623 A2 (WYETH CORP [US]; KUNZ<br>ARTHUR [US]; MORAN JUSTIN KEITH [US];<br>RUBINO JOS) 13 November 2003 (2003-11-13)<br>Abstract; example 5.     | 1-26                  |
|           | -----<br>-/--                                                                                                                                            |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2006

Date of mailing of the international search report

12/12/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

LOPEZ GARCIA, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/025736

118

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                    |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No.                              |
| Y                                                    | BOGHAERT E R ET AL: "ANTIBODY-TARGETED CHEMOTHERAPY WITH THE CALICHEAMICIN CONJUGATE HU3S193-N-ACETYL GAMMA CALICHEAMICIN DIMETHYL HYDRAZIDE TARGETS LEWISY AND ELIMINATES LEWSIY - POSITIVE HUMAN CARCINOMA CELLS AND XENOGRAFTS" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 10, no. 13, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 4538-4549, XP008060140<br>ISSN: 1078-0432<br>Abstract; p. 4540; col. 1, "Plasmon resonance analysis (BIAcore)"; Fig. 1; Fig. 2. | 1-26                                               |
| X                                                    | JOHNE B ET AL: "Epitope mapping and binding kinetics of monoclonal antibodies studied by real time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. 2 APR 1993, vol. 160, no. 2, 2 April 1993 (1993-04-02), pages 191-198, XP002405676<br>ISSN: 0022-1759<br>Abstract; p. 193, col. 1; Fig. 2A                                                                                                                                              | 1,4,6-8,<br>12,14,<br>15,17,<br>18,21,<br>23,24,26 |
| X                                                    | VAREIRO MARGARIDA M L M ET AL: "Surface plasmon fluorescence measurements of human chorionic gonadotrophin: role of antibody orientation in obtaining enhanced sensitivity and limit of detection." ANALYTICAL CHEMISTRY. 15 APR 2005, vol. 77, no. 8, 15 April 2005 (2005-04-15), pages 2426-2431, XP002405677<br>ISSN: 0003-2700<br>Abstract; Fig .2.                                                                                                                                         | 1,4,6-8,<br>12,14,<br>15,17,<br>18,21,<br>23,24,26 |
| Y                                                    | DIJOSEPH J F ET AL: "ANTIBODY-TARGETED CHEMOTHERAPY WITH CMC-544: A CD22-TARGETED IMMUNOCONJUGATE OF CALICHEAMICIN FOR THE TREATMENT OF B-LYMPHOID MALIGNANCIES" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 103, no. 5, March 2004 (2004-03), pages 1807-1814, XP008060153<br>ISSN: 0006-4971<br>Abstract; p. 1809, col. 1, "Pharmacokinetics of CMC-544 in tumour-bearing and nontumor bearing mice".                                                                                  | 1-26                                               |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/025736

119

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 03005890                               | A2 | 23-01-2003          | CA 2453141 A1              | 23-01-2003          |
|                                           |    |                     | EP 1411816 A2              | 28-04-2004          |
|                                           |    |                     | JP 2005512021 T            | 28-04-2005          |
| WO 03092623                               | A2 | 13-11-2003          | AU 2003231293 A1           | 17-11-2003          |
|                                           |    |                     | BR 0309868 A               | 18-10-2005          |
|                                           |    |                     | CA 2483552 A1              | 13-11-2003          |
|                                           |    |                     | CN 1665532 A               | 07-09-2005          |
|                                           |    |                     | EP 1507556 A2              | 23-02-2005          |
|                                           |    |                     | JP 2005524700 T            | 18-08-2005          |
|                                           |    |                     | MX PA04010792 A            | 07-03-2005          |

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

|                                                                                                                                  |                                                                         |                                                             |                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>40000-355955                                                                            | FOR FURTHER ACTION                                                      |                                                             | See item 4 below |
| International application No.<br>PCT/US2006/025736                                                                               | International filing date (day/month/year)<br>30 June 2006 (30.06.2006) | Priority date (day/month/year)<br>01 July 2005 (01.07.2005) |                  |
| International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated)<br>See relevant information in Form PCT/ISA/237 |                                                                         |                                                             |                  |
| Applicant<br>WYETH                                                                                                               |                                                                         |                                                             |                  |

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

- |                                     |              |                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Box No. I    | Basis of the report                                                                                                                                             |
| <input type="checkbox"/>            | Box No. II   | Priority                                                                                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Box No. III  | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability                                                                |
| <input type="checkbox"/>            | Box No. IV   | Lack of unity of invention                                                                                                                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Box No. V    | Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| <input type="checkbox"/>            | Box No. VI   | Certain documents cited                                                                                                                                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Box No. VII  | Certain defects in the international application                                                                                                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Box No. VIII | Certain observations on the international application                                                                                                           |

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).

|                                                                                                                                     |                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br><br>Facsimile No. +41 22 338 82 70 | Date of issuance of this report<br>09 January 2008 (09.01.2008)         |
|                                                                                                                                     | Authorized officer<br><br>Nora Lindner<br><br>e-mail: pt02.pct@wipo.int |

# PATENT COOPERATION TREATY

221

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

## PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY  
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing  
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference  
see form PCT/ISA/220

**FOR FURTHER ACTION**  
See paragraph 2 below

International application No.  
PCT/US2006/025736

International filing date (day/month/year)  
30.06.2006

Priority date (day/month/year)  
01.07.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
INV. G01N33/543 G01N21/55

Applicant  
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of  
this opinion

see form  
PCT/ISA/210

Authorized Officer

LOPEZ GARCIA, F

Telephone No. +49 89 2399-2171



**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

122  
International application No.  
PCT/US2006/025736

---

**Box No. I Basis of the opinion**

---

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
  - ☒ the international application in the language in which it was filed
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
  - a. type of material:
    - ☐ a sequence listing
    - ☐ table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material:
    - ☐ on paper
    - ☐ in electronic form
  - c. time of filing/furnishing:
    - ☐ contained in the international application as filed.
    - ☐ filed together with the international application in electronic form.
    - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

123  
International application No.  
PCT/US2006/025736

---

**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

---

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1, 9, 18 (all partially)

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1, 9, 18 (all partially)

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

224  
International application No.  
PCT/US2006/025736

---

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

---

**1. Statement**

|                               |             |                                               |
|-------------------------------|-------------|-----------------------------------------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | 2, 3, 5, 9-11, 13, 16, 19, 20, 22, 25         |
|                               | No: Claims  | 1, 4, 6-8, 12, 14, 15, 17, 18, 21, 23, 24, 26 |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims |                                               |
|                               | No: Claims  | 1-26                                          |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-26                                          |
|                               | No: Claims  |                                               |

**2. Citations and explanations**

**see separate sheet**

---

**Box No. VII Certain defects in the international application**

---

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

**see separate sheet**

---

**Box No. VIII Certain observations on the international application**

---

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

**see separate sheet**

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING  
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

125  
International application No.

PCT/US2006/025736

**Re Item III**

**Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

1. Present claim 1, 9 and 18 relate to methods using certain compounds, wherein said compounds have been defined by a desired property or effect, namely "targeting molecule" or "drug binding agent". However, the description does not provide support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT for any such compound having the said property or effect and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of the claim (PCT Guidelines 9.19 and 9.20).

The search of claims 1, 9 and 18 was consequently restricted to the specifically disclosed compounds having the desired property or effect, see description examples 1-5 and to the broad concept of compound having the desired property or effect, namely, to "targeting molecules" which are antibodies and to "drug binding agents" which are antibodies.

2. Present claims 1, 9 and 18 relate to methods, wherein a certain property of the solid support is measured, namely a change in mass property. However, the description does not provide support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT for any change in mass property and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of the claim (PCT Guidelines 9.19 and 9.20).

The search of claims 1, 9 and 18 was consequently restricted to the specifically disclosed methods wherein the change in mass property is measured by plasmon resonance, see description p. 2, l. 10 and examples 1-5.

**Re Item V**

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;  
citations and explanations supporting such statement**

3. Reference is made to the following documents:

- D1: WO 03/005890 A2 (UNIV ARIZONA [US]; BEAUDOIN STEPHEN P [US]; BOOKSH KARL S [US]; KHAIRA) 23 January 2003 (2003-01-23)
- D2: WO 03/092623 A2 (WYETH CORP [US]; KUNZ ARTHUR [US]; MORAN JUSTIN KEITH [US]; RUBINO JOS) 13 November 2003 (2003-11-13)
- D3: BOGHAERT E R ET AL: "ANTIBODY-TARGETED CHEMOTHERAPY WITH THE CALICHEAMICIN CONJUGATE HU3S193-N-ACETYL GAMMA CALICHEAMICIN DIMETHYL HYDRAZIDE TARGETS LEWISY AND ELIMINATES LEWSIY - POSITIVE HUMAN CARCINOMA CELLS AND XENOGRAFTS" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 10, no. 13, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 4538-4549, XP008060140 ISSN: 1078-0432
- D4: JOHNE B ET AL: "Epitope mapping and binding kinetics of monoclonal antibodies studied by real time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. 2 APR 1993, vol. 160, no. 2, 2 April 1993 (1993-04-02), pages 191-198, XP002405676 ISSN: 0022-1759
- D5: VAREIRO MARGARIDA M L M ET AL: "Surface plasmon fluorescence measurements of human chorionic gonadotrophin: role of antibody orientation in obtaining enhanced sensitivity and limit of detection." ANALYTICAL CHEMISTRY. 15 APR 2005, vol. 77, no. 8, 15 April 2005 (2005-04-15), pages 2426-2431, XP002405677 ISSN: 0003-2700
- D6: DIJOSEPH J F ET AL: "Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: A CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies" BLOOD, vol. 103, no. 5, March 2004 (2004-03), pages 1807-1814, XP008060153 ISSN: 0006-4971

4. Novelty (Art. 33(2) PCT).

D4 discloses in Fig. 2(a) a myoglobin sandwich assay following the sequence RAM-Fc + bottom Mab + myoglobin + top Mab. It can be seen that after binding of myoglobin to bottom Mab, a complex comprising the bottom Mab and myoglobin is formed, which could be regarded as the present targeting molecule/drug conjugate. The amount of drug

(myoglobin) bound is determined by the binding of the top Mab. It is noted that the nature of the interaction (covalent or noncovalent) of the targeting molecule and the drug is not set in the claims. Thus, claims 1, 4, 6-8, 12, 14, 15, 17, 18, 21, 23, 24, 26 are not novel.

D5 discloses a method for measuring the binding of certain compounds by plasmon resonance. In the absence of a better definition for drug in the claims, the antibody-drug conjugate could be any of the Fab-hCG monobiotinylated fragments of Fig. 2(ii). In Fig. 2(ii), the hCG could be the drug. Thus, in Fig. 2(ii) the biotinylated antibody is bound to its target (streptavidin) and the drug (hCG) is found to its drug binding agent (anti-hCG antibody). Thus, claims 1, 4, 6-8, 12, 14, 15, 17, 18, 21, 23, 24, 26 are not novel.

It should also be taken into account that the novelty of the methods of claims 1, 8 and 19, without the limitation set in point III, above, could be destroyed also by the method of Fig. 2(i), since there is freedom to select what is the target, targeting molecule and drug. Thus, the randomly biotinylated antibody could be the targeting molecule/drug complex, wherein the targeting molecule is biotin and the drug is the antibody, the target could be streptavidin, and the drug binding agent is hCG.

Otherwise, the methods limited according to point III, above, are novel over D1-D3 and D6:

D1, wherein plasmon resonance is used to determined binding of myoglobin to immobilized anti-myoglobin antibody (examples 1 and 2) does not use a further drug binding agent to determine the amount of drug bound (anti-myoglobin antibody).

D2, wherein binding analysis of CMC-544 to immobilized CD22mFc fragment were performed using plasmon resonance (example 5), does not use a further drug binding agent (anti-calicheamicin antibody) to determine the amount of drug bound.

D3, wherein binding analysis of hu3S193-calichDMH to the immobilized antigen were performed using plasmon resonance (Fig. 2), does not use a further drug binding agent (anti-calicheamicin antibody) to determine the amount of drug bound.

D6 discloses the determination of the pharmacokinetics of CMC-544 by an ELISA assay.

5. Inventive step (Art. 33(3) PCT).

D6 is regarded as the closest prior art. It provides a method for determining the pharmacokinetics of CMC-544 in an ELISA assay.

The present application uses a different technique.

The technical problem is regarded as the provision of alternative methods for determining the pharmacokinetics of drug-delivering therapies.

The present solution of claims 1-26 solves the problem but not in an inventive manner.

Plasmon resonance is a well known technique that can be used for determining the binding of two species, such as antibody/antigen binding (D1-D5). D1 further says the sandwich Elisa methods may be employed without using labeled molecules. Thus, the skilled person wishing to provide alternatives to the methods of D6 could also think on using the plasmon resonance instead of Elisa methods with labeled molecules. He would do so because it appears to be an easier and faster way than standard ELISA methods, as it does not require labeled compounds. Moreover, the skilled person has from D6 all he needs for carrying the method using plasmon resonance. Thus, the target (Cd22mFc), the conjugate (CMC-544) and the drug binding agent (anticalicheamicin antibody) are provided. Therefore, the subject-matter of claims 1-26 is not inventive over the combination of D1 and D6.

The same is applicable to the combination of D6 and D2 or D3. In this case, D2 or D3 have provided already a binding assay of antibody-calicheamicin conjugates to their targets by using plasmon resonance. Thus, the determination of the pharmacokinetics of antibody-calicheamicin conjugates of D6 using plasmon resonance would be obvious to the skilled person, who only needs to add the anticalicheamicin antibody provided in D6 to the assays of D2 or D3. He would do so because it is another way of providing alternative methods for determining the pharmacokinetics of drug-delivering therapies in an easier way than in D6, since no label is required. Thus, claims 1-26 are not inventive.

6. Industrial applicability (Art. 33(4) PCT)

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING  
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/025736

The subject-matter of claims 1-26 meets the requirements of Art. 33(4) PCT.

**Re Item VII**

**Certain defects in the international application**

7. Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in the documents D1-D6 is not mentioned in the description, nor are these documents identified therein.

**Re Item VIII**

**Certain observations on the international application**

8. The vague and imprecise statement in the description on p. 1, paragraph 1 and p. 19, paragraph 2 implies that the subject-matter for which protection is sought may be different to that defined by the claims, thereby resulting in lack of clarity (Article 6 PCT) when used to interpret them.

9. The applicant could be requested to delete the expression "incorporated by reference" during the regional phase.

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2006/025736

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MEIGS, Julie, Broadus  
PILLSBURY WINTHROP SHAW PITTMAN LLP  
P.o. Box 10500  
McLean, VA 22102  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

|                                                                      |                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>20 September 2006 (20.09.2006)   |                                                                         |
| Applicant's or agent's file reference<br>40000-355955                | IMPORTANT NOTIFICATION                                                  |
| International application No.<br>PCT/US2006/025736                   | International filing date (day/month/year)<br>30 June 2006 (30.06.2006) |
| International publication date (day/month/year)<br>Not yet published | Priority date (day/month/year)<br>01 July 2005 (01.07.2005)             |
| Applicant<br>WYETH et al                                             |                                                                         |

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk (\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| Priority date             | Priority application No. | Country or regional Office<br>or PCT receiving Office | Date of receipt<br>of priority document |
|---------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 01 July 2005 (01.07.2005) | 60/695,419               | US                                                    | 18 August 2006 (18.08.2006)             |

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nora Lindner

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 89 65  
Telephone No. +41 22 338 97 20

## PATENT COOPERATION TREATY

131  
PCT/US2006/025736

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MEIGS, Julie, Broadus  
PILLSBURY WINTHROP SHAW PITTMAN LLP  
P.o. Box 10500  
McLean, VA 22102  
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)  
07 January 2008 (07.01.2008)Applicant's or agent's file reference  
40000-355955

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.  
PCT/US2006/025736International filing date (day/month/year)  
30 June 2006 (30.06.2006)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

DAMLE, Nitkin, K.  
53 Stevenson Lane  
Upper Saddle River, NJ 07458  
United States of AmericaState of Nationality  
USState of Residence  
US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

DAMLE, Nitin, K.  
53 Stevenson Lane  
Upper Saddle River, NJ 07458  
United States of AmericaState of Nationality  
USState of Residence  
US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned  
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Smahi Abderrezak

Facsimile No. +41 22 338 89 65

e-mail pt02.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 02



**Industria y Comercio**

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

**TARJETA ARCHIVO TEMATICO**

134

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION \_\_\_\_\_ PCT X MODELO DE UTILIDAD \_\_\_\_\_ DISEÑO INDUSTRIAL \_\_\_\_\_

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional : G01N 33/543, G01N 21/55

(71) Solicitante(s)

**WYETH**

(72) Inventor(es) DAMLE, Nitin K.; KHANDKE, Kiran y BOGHAERT, Erwin R.

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad

(31) *No. Prioridad*

(32)

*Fecha*

(33) *País*

60/695,419

01/07/2005

US

(85) Fecha límite inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 30/06/2006

No. de solicitud PCT/US2006/025736

(87) Publicación internacional:

Fecha: 11/01/07

No. Publicación : WO/2007/005690

(54) Título:

**METODOS PARA DETERMINAR LAS FARMACOCINETICAS DE TERAPIAS DIRIGIDAS**

(57) Resumen:

La presente invención se refiere a métodos para determinar las farmacocinéticas de terapias dirigidas usando técnicas de detección de masa.



# Industria y Comercio

SUPERINTENDENTE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-007864- -00000-0000

Fecha: 2008-01-28 16:14:15 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 134

Delegatura de Propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

## REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

|                                                                                                             | USUARIO | RADICADOR |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|
| PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ( )                                                             | ( )     | ( )       |
| -Indicación de que se solicita la concesión de una patente.                                                 | (X)     | (X)       |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | (X)     | (X)       |
| -Descripción de la invención.                                                                               | (X)     | (X)       |
| -Dibujos de ser estos pertinentes.                                                                          | ( )     | ( )       |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | (X)     | (X)       |
| COMPLETA (X)                                                                                                |         |           |
| INCOMPLETA                                                                                                  | ( )     | ( )       |
| DISEÑO INDUSTRIAL ( )                                                                                       |         |           |
| -Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.                                            | ( )     | ( )       |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | ( )     | ( )       |
| -Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. | ( )     | ( )       |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | ( )     | ( )       |
| COMPLETA ( )                                                                                                |         |           |
| INCOMPLETA                                                                                                  | ( )     | ( )       |
| ESQUEMA DE TRAZADO ( )                                                                                      |         |           |
| -Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.                                            | ( )     | ( )       |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | ( )     | ( )       |
| -Representación gráfica del Esquema Trazado.                                                                | ( )     | ( )       |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | ( )     | ( )       |
| COMPLETA ( )                                                                                                |         |           |
| INCOMPLETA                                                                                                  | ( )     | ( )       |

Firma Responsable:

Claudia M. Navarro

Fecha:

ENERO 28, 2008

136

REPUBLICA DE COLOMBIA  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 8.7864            |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2006/025736 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 01/02/2008        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | 2711              |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k). Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CHEPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 22 FEB. 2008  
adpall