



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0613694-0 A2**

(22) Data de Depósito: 30/06/2006
(43) Data da Publicação: 25/01/2011
(RPI 2090)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/543
G01N 21/55

(54) Título: **MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DE TERAPIAS DE OBJETIVO**

(30) Prioridade Unionista: 01/07/2005 US 60/695,419

(73) Titular(es): WYETH

(72) Inventor(es): ERWIN R. BOGHAERT, KIRAN KHANDKE, NITKIN K. DAMLE

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006025736 de 30/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/005690 de 11/01/2007

(57) Resumo: MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DE TERAPIAS DE OBJETIVO. A presente invenção refere-se a métodos para a determinação da farmacocinética de terapias objetivadas utilizando técnicas de detecção de massa.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DE TERAPIAS DE OBJETIVO".

PEDIDOS RELACIONADOS.

É reivindicada prioridade do Pedido Provisório de Patente US Nº 5 60/695.419, arquivado em 1 de julho de 2005, que é aqui incorporado pela referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO.

A presente invenção refere-se geralmente aos métodos de determinação das propriedades farmacocinéticas das terapias dirigidas (por exemplo, imunoconjugados) pela utilização de técnicas de sensibilidade à massa.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO.

As macromoléculas sintéticas e naturais se tornaram terapias estabelecidas no tratamento do câncer. Os anticorpos provaram sua eficácia clínica quando administrados como um anticorpo livre ou não-conjugado, ou como um conjugado anticorpo/fármaco. De acordo com uma última abordagem, um agente terapêutico é ligado a um anticorpo com especificidade de ligação para uma população definida de células-alvo. Os agentes terapêuticos que foram conjugados aos anticorpos monoclonais incluem citotoxinas, modificadores de resposta biológica, enzimas (por exemplo, ribonucleases), proteínas e peptídeos de indução de apoptose e radioisótopos.

A liberação de fármaco mediado por anticorpo para as células de tumor aumenta a eficácia do fármaco minimizando sua absorção em tecidos normais. Veja, por exemplo, 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 de ozogamicina) é uma imunoterapia dirigida comercialmente disponível que trabalha de acordo com esse princípio e que está aprovada para o tratamento da leucemia mieloide aguda em pacientes idosos. Veja Sievers et al., (1999) Blood 93: 3678-3684. Nesse caso, a molécula alvo é um anticorpo anti-CD33 monoclonal que é conjugado à caliqueamicina. Os Exemplos adicionais incluem o ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN®) e o tositumomab

(BEXXAR®), que são os anticorpos anti-CD20 radiorrotulados. Veja Dillman, Clin. Exp. Med., 2006, 6(1):1-12.

5 Independente do progresso no desenvolvimento de novas terapias dirigidas por anticorpo, as características fisiológica que conferem um nível terapêutico favorável na clínica ainda não são bem compreendidas. Os ensaios bioquímicos simples (por exemplo, a afinidade do anticorpo por seu antígeno) não predizem necessariamente a eficácia. Veja Graff & Wittrup, Cancer Res., 2003, 63(6):1288-1296. Os parâmetros biológicos in vivo tal como a meia-vida de circulação, as taxas da distribuição nos tecidos e a taxa de degradação do conjugado podem ser mais úteis na comparação do potencial de eficácia terapêutica destas moléculas. Entretanto, as experiências pré-clínicas projetadas para avaliar estes parâmetros são difíceis de realizar porque requerem tipicamente um grande número de experimentos animais e radiorrotulação de conjugado.

15 Para abordar a necessidade de métodos de predição da eficácia clínica, a presente invenção fornece ensaios de ressonância do plasmônio para a caracterização farmacocinética das terapias dirigidas seguindo sua administração a um paciente. Os ensaios aqui descritos detectam precisamente e com reprodutibilidade quantidades de moléculas alvo e de conjugados molécula alvo/fármaco em um único e mínimo volume de amostra. Baseado nesta determinação, a meia-vida de circulação dos conjugados molécula alvo/fármaco, as taxas da degradação conjugado e a estabilidade do ligante podem ser monitoradas em um paciente.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO.

25 A presente invenção fornece métodos de determinação de uma quantidade de moléculas alvo e uma quantidade de conjugados molécula alvo/fármaco em uma amostra. Em uma modalidade representativa da presente invenção, o método compreende as etapas de: (a) fornecer um suporte sólido compreendendo uma superfície na qual um alvo é imobilizado; (b) 30 fornecer uma amostra compreendendo diversos conjugados molécula alvo/fármaco; (c) contactar a amostra com o alvo imobilizado na superfície do suporte sólido; (d) detectar a formação na superfície do suporte sólido de um

primeiro complexo de ligação (i) da molécula alvo e (ii) o alvo na superfície do suporte sólido, em que a formação do primeiro complexo de ligação causa uma primeira alteração mensurável na propriedade da massa do suporte sólido indicando uma quantidade de moléculas alvo na amostra; (e) contactar o primeiro complexo de ligação com um agente de ligação do fármaco que se liga especificamente com o fármaco do conjugado molécula alvo/fármaco; e (f) detectar a formação na superfície do suporte sólido de um segundo complexo de ligação (i) do agente de ligação do fármaco com (ii) o primeiro complexo de ligação, em que a formação do segundo complexo de ligação causa uma segunda alteração mensurável na propriedade da massa do suporte sólido indicando uma quantidade de conjugados molécula alvo/fármaco na amostra.

Os métodos de determinação de uma quantidade de conjugados molécula alvo/fármaco em uma amostra podem também compreender as etapas de: (a) fornecer um suporte sólido compreendendo uma superfície na qual um primeiro complexo de ligação é imobilizado, em que o complexo de ligação compreende (i) um alvo e (ii) um conjugado molécula alvo/fármaco ligados ao alvo; (b) contactar um agente de ligação do fármaco que liga especificamente o fármaco do conjugado molécula alvo/fármaco com o primeiro complexo de ligação imobilizado na superfície do suporte sólido; e (c) detectar a formação de um segundo complexo de ligação (i) do agente de ligação do fármaco com (ii) o primeiro complexo de ligação na superfície do suporte sólido, em que a formação do complexo causa uma alteração mensurável na propriedade da massa do suporte sólido indicando uma quantidade do conjugado molécula alvo/fármaco na amostra.

Em um outro aspecto de acordo com a presente invenção, são fornecidos os métodos de determinação de uma quantidade média de suprimento do fármaco por molécula alvo. Por exemplo, um método de determinação do suprimento do fármaco de conjugados molécula alvo/fármaco em uma amostra pode compreender as etapas de: (a) fornecer um suporte sólido em que são ligados os conjugados molécula alvo/fármaco de uma amostra; (b) determinar uma quantidade de fármaco na amostra medindo

uma alteração na propriedade da massa de um suporte sólido quando da ligação de um agente de ligação do fármaco, que liga especificamente o fármaco do conjugado molécula alvo/fármaco, com os conjugados molécula alvo/fármaco na superfície do suporte sólido; e (c) calcular uma quantidade média de fármaco por conjugados molécula alvo/fármaco dividindo a quantidade do fármaco de (b) por uma quantidade de moléculas alvo na amostra.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS.

A Figura 1 mostra um sensograma de um método de detecção por sanduíche. Na primeira fase da curva (entre as setas 1 e 2), a amostra do conjugado de anticorpo/caliqueamicina foi corrido sobre um excesso de antígeno imobilizado. Uma segunda fase (entre as setas 3 e 4) foi iniciada adicionando um anticorpo anticaliqueamicina. A Resposta 1 indica a adição de massa proporcional à concentração do anticorpo na amostra, e a Resposta 2 é proporcional à quantidade de caliqueamicina no conjugado de anticorpo/caliqueamicina. O termo RU, são unidades de ressonância; e os círculos cinzentos, são períodos de lavagem.

As Figuras 2A-2B mostram a correlação entre a quantidade de anticorpo ou de conjugado de anticorpo/fármaco e a concentração de amostras padrão. A Figura 2A é um sensograma mostrando unidades de ressonância em função do tempo para cada uma das concentrações indicadas (ng/ml) de hP67.6-AcBut-CalichDMH. A Figura 2B é um gráfico de linha mostrando unidades de ressonância em função da concentração do anticorpo de hP67.6-AcBut-CalichDMH + de anticaliqueamicina (círculo cheio preto), hP67.6-AcBut-CalichDMH (círculo cheio cinzento), e anticorpo anticaliqueamicina (círculo vazio).

As Figuras 3A-3C mostram as concentrações no plasma da hP67.6-AcBut-CalichDMH determinada usando um método de detecção por sanduíche tal como descrito nos Exemplos 3 e 4. Cada animal recebeu o conjugado de anticorpo/fármaco para uma dose total de 3 µg de caliqueamicina. É indicada a dose de conjugado anticorpo/fármaco expressa em mg/kg. As linhas contínuas representam animais veículos de tumor de Ramos positivo para o CD22; as linhas pontilhadas representam camundongos livres de tumor.

A Figura 3A mostra a Resposta 1, isto é, a ligação da hP67.6 e da hP67.6-AcBut-CalichDMH, com o antígeno CD33 imobilizado em um chip CM5.

5 A Figura 3B mostra a Resposta 2, isto é, a ligação do anticliqueamicina ao hP67.6-acBut-CalichDMH já ligado ao CD33 imobilizado em um chip CM5. As cinéticas da hP67.6-AcBut-CalichDMH no plasma são similares nos animais veículos de tumor e em animais livres de tumor.

10 A Figura 3C mostra a proporção da Resposta 2 em relação à Resposta 1. A concentração decrescente do conjugado de anticorpo/fármaco como uma fração da concentração da porção de anticorpo do conjugado anticorpo/fármaco indica a liberação preferencial do conjugado versus um anticorpo não-conjugado.

15 A Figura 4 é um gráfico de linha mostrando unidades de ressonância em função da concentração de G5/44-AcBut-CalichDMH (ozogamicina do inotuzumab) + anticorpo anticliqueamicina (círculo cheio preto), G5/44-AcBut-CalichDMH (círculo cheio cinzento), e anticorpo anticliqueamicina (círculo vazio).

20 As Figuras 5A-5C mostram as concentrações no plasma da G5/44-AcBut-CalichDMH determinadas usando um método de detecção de sanduíche tal como descrito nos Exemplos 3 e 5. O anticorpo G5/44 anti-CD22 foi suprido com 72 µg de caliqueamicina por mg de anticorpo e cada animal recebeu o conjugado anticorpo/fármaco para uma dose total de 3 µg de caliqueamicina. As linhas contínuas representam animais sofrendo de tumor de Ramos positivo para o CD22; as linhas pontilhadas representam
25 camundongos livres de tumor.

A Figura 5A mostra a Resposta 1, isto é, a ligação da G5/44 e da G5/44-AcBut-CalichDMH com o antígeno CD22 imobilizado em um chip CM5.

30 A Figura 5B mostra a Resposta 2, isto é, a ligação do anticliqueamicina com a G5/44-acBut-CalichDMH já ligada ao CD22 imobilizado em um chip CM5. A presença do tumor de Ramos positivo para o CD22 (linhas contínuas) diminuiu a concentração média do anticorpo G5/44 e do

conjugado 65/44-AcBUt-CaliChDMH no plasma.

A Figura 5C mostra a relação da Resposta 2 relativo à Resposta 1. A concentração decrescente do conjugado de anticorpo/fármaco como uma fração da concentração da porção do anticorpo do conjugado de anticorpo/fármaco indica a liberação preferencial do conjugado contra anticorpo não-conjugado. A remoção do caliqueamicina do anticorpo não foi influenciada pela presença do tumor de CD22-positive Ramos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO.

A presente invenção fornece métodos de caracterização de amostras compreendendo composições para uma terapia dirigida, isto é, uma molécula alvo conjugada diretamente ou indiretamente a um fármaco. As amostras que contêm conjugados molécula alvo/fármaco podem incluir algumas proporções de partes constituintes (isto é, molécula alvo não-conjugada e fármaco livre), por exemplo, em consequência de conjugação incompleta, da degradação do conjugado, etc. Em geral, a molécula alvo não-conjugada e o fármaco livre, individualmente, possuem eficácia limitada e podem contribuir para a toxicidade ao paciente. Conseqüentemente, é importante a monitoração da progressão em pacientes que recebem terapias dirigidas, suprimento de fármaco e a concentração de conjugados molécula alvo/fármaco (em vez das partes constituintes). Os métodos descritos fornecem tal determinação, que pode ser usada para avaliar parâmetros farmacocinéticos de um conjugado molécula alvo/fármaco, tais como a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção após a administração a um paciente.

Em comparação aos métodos anteriores, a presente descrição descreve o uso de uma técnica sensível à massa para detectar os conjugados molécula alvo/fármaco, em que tais conjugados são lábeis. A concentração de conjugados molécula alvo/fármaco pode ser determinada precisamente no soro e/ou no local do alvo para avaliar a meia-vida na circulação, a estabilidade do ligante, e uma quantidade do fármaco que é liberada no local ao qual foi dirigida. Uma única, amostra de pequeno volume pode ser usada para executar seqüencialmente etapas de múltipla detecção em uma mesma

amostra, que permite o cálculo do suprimento do fármaco no conjugado molécula alvo/fármaco.

I. Conjugados Molécula alvo/Fármaco.

As moléculas alvo que podem ser usadas nos métodos descritos
5 incluem qualquer molécula que mostre uma ligação específica a um alvo. A
ligação específica se refere a uma afinidade entre duas moléculas que resul-
ta na ligação preferencial em uma amostra heterogênea. A ligação é caracte-
rizada geralmente por uma afinidade de pelo menos aproximadamente de
10⁻⁷ M ou mais elevada, tal como de pelo menos aproximadamente 10⁻⁸ M
10 ou mais elevada, ou de pelo menos aproximadamente 10⁻⁹ M ou mais eleva-
da, ou de pelo menos aproximadamente 10⁻¹¹ M ou mais elevada, ou de pelo
menos aproximadamente 10⁻¹² M ou mais elevada.

Moléculas alvo incluem também qualquer molécula que, depois
da administração a um paciente, se liga seletivamente às células que ex-
15 pressam o alvo. O termo "alvo" se refere ao movimento e/ou ao acúmulo
preferencial in vivo de uma molécula em um local do alvo (por exemplo, célu-
las ou tecidos) em comparação com um local de controle. Um local do alvo
compreende as células que expressam um alvo, isto é, um local pretendido
para o acúmulo da molécula alvo ou do conjugado molécula alvo/fármaco.
20 Um local de controle compreende células em que falta substancialmente a
expressão do alvo e que conseqüentemente faltam substancialmente a liga-
ção e/ou o acúmulo de uma molécula alvo administrada ou de conjugados
molécula alvo/fármaco. A ligação seletiva se refere geralmente a uma locali-
zação preferencial de um conjugado molécula alvo/fármaco de tal modo que
25 uma quantidade de moléculas alvo em um local do alvo é aproximadamente
2 vezes maior do que uma quantidade de moléculas alvo em um local de
controle, ou aproximadamente 5 vezes maior, ou aproximadamente 10 vezes
maior ou ainda mais.

Moléculas alvo representativas incluem anticorpos, proteínas,
30 peptídios, miméticos de peptídio, ácidos nucleicos de peptídio (PNAs), oligo-
nucleotídios, ligantes, lecitinas, e todas as outras moléculas que se ligam
especificamente e/ou seletivamente a um alvo.

Os alvos ligados por moléculas alvo estão associados geralmente com um estado doente, um estado suscetível da doença, ou uma condição que necessite de tratamento. Os alvos representativos incluem antígenos, haptenos, proteínas, peptídios, receptores, oligonucleotídios, carboidratos, e todas as outras moléculas expressadas em níveis elevados por células de um local do alvo. Um alvo está preferivelmente presente na superfície celular ou de outro modo acessível para as moléculas alvo. Um local do alvo pode estar localizado, em um local tal como um tumor sólido, ou não estar localizado como em doenças malignas do sangue. Por exemplo, um local do alvo pode compreender as células que expressam os antígenos associados com tumor (TAA), os antígenos expressados em outras células malignas, nas células imunes que contribuem para a inflamação, na alergia, na autoimunidade, etc.

Em um aspecto de acordo com a presente invenção, a molécula alvo é um anticorpo e a invenção se refere a caracterizar as amostras compreendendo imunoconjugados, isto é, conjugados de anticorpo/fármaco. A porção do anticorpo de um conjugado de anticorpo/fármaco pode compreender qualquer tipo de anticorpo, incluindo, por exemplo, os anticorpos que têm a estrutura tetramérica (por exemplo, similar aos anticorpos naturais), ou a qualquer outra estrutura possuindo de pelo menos uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina ou de pelo menos uma região de cadeia pesada da imunoglobulina, ou fragmentos das mesmas, ligados a antígenos (por exemplo, Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂ ou fragmentos de Fv). Os métodos descritos podem também ser usados para caracterizar os conjugados preparados usando anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, dímeros, anticorpos de cadeia simples, anticorpos tetravalentes, e/ou anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos).

Para a preparação de terapias direcionadas anticâncer, os antígenos associados a tumor foram identificados por se ligarem especificamente às células de câncer dos tumores sólidos, tais como do carcinoma de pulmão escamoso/adenomatoso (carcinoma das células não-pequenas do pulmão), do carcinoma invasivo do seio, do carcinoma colo-retal, do carci-

noma gástrico, do carcinoma cervical escamoso, do adenocarcinoma endometrial invasivo, do carcinoma invasivo do pâncreas, do carcinoma ovariano, do carcinoma vesical escamoso, e do coriocarcinoma. Os antígenos para a terapia dirigida de doenças malignas hematológicas podem também ser alvos úteis do fármaco, por exemplo, para o tratamento dos linfomas e das leucemias, tais como incluindo, mas não-limitado aos linfomas de grau inferior/folicular não de Hodgkin (NHL), NHL pouco linfocitária (SL), NHL de grau intermediário/folicular, NHL difuso de grau intermediário, NHL imunoblástico de grau elevado, NHL linfoblástico de grau elevado, NHL de célula pequena não-clivada de grau elevado, NHL de doença disseminada e a macroglobulinemia de Waldenstrom, leucemia leucocitária crônica, leucemia mielogenosa aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocitária crônica, leucemia mielogenosa crônica, leucemia linfoblástica, leucemia linfocitária, leucemia monocítica, leucemia mielogenosa, e leucemia promielocítica.

Os anticorpos representativos que podem ser usados preparar conjugados de anticorpo/fármaco para a terapia dirigida incluem os anticorpos anti-5T4, anticorpos anti-CD19, anticorpos anti-CD20 (por exemplo, RITUXAN[®], ZEVALI N[®], BEXXAR[®]), anticorpos anti-CD22, anticorpos anti-CD33 (por exemplo, MYLOTARG[®]), anticorpos Y anti-Lewis (por exemplo, Hu3S193, Mthu3S193, AGmthu3S193), anticorpos anti-HER-2 (por exemplo, HERCEPTIN[®] (trastuzumab), MDX-210, OMNITARG[®] (pertuzumab, rhuMAb 2C4)), anticorpos anti-CD52 (por exemplo, CAMPATH[®]), anticorpos anti-EGFR (por exemplo, ERBITUX[®] (cetuximab), ABX-EGF (panitumumab)), anticorpos anti-VEGF (por exemplo, AVASTIN[®] (bevacizumab)), anticorpos complexos anti-DNA/histona (por exemplo, ch-TNT-1/b) anticorpos anti-CEA (por exemplo, CEA-Cide, YMB-1003), hLM609, anti-CD47 (por exemplo, 6H9), anticorpos anti-VEGFR2 (ou receptor contendo o domínio de inserção da quinase, KDR) (por exemplo, IMC-1C11), anticorpos Ep-CAM (por exemplo, ING-1), anticorpos anti-FAP (por exemplo, sibrotuzumab), anticorpos anti-DR4 (por exemplo, TRAIL-R), anticorpos anti-receptor da progesterona (por exemplo, 2C5), anticorpos anti-CA19.9 (por exemplo, GIVAREX[®]), e anticorpos do antifibrina (por exemplo, MH-1).

Tal como aqui utilizado, o termo "um fármaco se refere a" se refere a qualquer substância que possua atividade biológica ou detectável, por exemplo, os agentes terapêuticos, agentes de ligação, etc, bem como os pró-fármacos, que são metabolizados em um agente ativo in vivo. O termo fármaco inclui também derivados do fármaco, em que um fármaco foi funcionalizado para permitir a conjugação com uma molécula alvo.

O fármaco pode ser ligado à molécula alvo diretamente ou indiretamente, mas a ligação é tal que é compatível com a preservação do efeito terapêutico da porção fármaco. O ligante pode ser estável ou hidrolisável, e qualquer técnica apropriada para ligar o fármaco ao anticorpo pode ser usada. Por exemplo, as hidrazidas e outros nucleófilos podem conjugados aos aldeídos gerados pela oxidação dos carboidratos que ocorrem naturalmente nos anticorpos. Os conjugados contendo hidrazona podem ser feitos pela introdução de grupos carbonila que fornecem as propriedades desejadas de liberação do fármaco. Os conjugados podem também ser feitos com um ligante possuindo um dissulfeto em uma extremidade, em uma cadeia alquila no meio, e um derivado da hidrazina na outra extremidade. Outros ligantes representativos são os ligantes reativos ao tiol tais como ésteres, amidas, aceto/acetais e ligantes sensíveis ao pH, tais como cis-aconitatos, que possuem um ácido carboxílico justaposto a uma ligação amida. Os ligantes podem também incluir agentes solubilizantes tais como o PEG para limitar a agressão dos conjugados molécula alvo/fármaco. Os ligantes peptídios também podem ser usados.

Os fármacos representativos incluem agentes anticâncer, tais como agentes citotóxicos, agentes quimioterapêuticos, agentes imunomoduladores, agentes antiangiogênico, agentes antiproliferativos, agentes pró-apoptóticos, enzimas e proteínas bioativas. Um fármaco também pode compreender um ácido nucléico terapêutico, tal como um gene codificando um agente imunomodulador, um agente antiangiogênico, um agente antiproliferativo ou um agente pro-apoptótico. Estes descritores do fármaco não são mutuamente exclusivos, e assim um agente terapêutico pode ser descrito usando um ou mais dos termos acima descritos. Os agentes terapêuticos

podem ser preparados como sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de quaisquer das formas acima. Além disso, os conjugados podem ser feitos usando veículos secundários como um agente citotóxico, tal como lipossomas ou polímeros, por exemplo.

5 O termo agente citotóxico se refere geralmente a um agente que inibe ou impede o funcionamento das células e/ou que resulta na destruição das células. Os agentes citotóxicos representativos incluem os antibióticos, os inibidores da polimerização da tubulina, agentes alquilantes que ligam com e rompem o DNA, e os agentes que quebram a síntese da proteína ou o
10 funcionamento de proteínas celulares essenciais tais como as proteínas quinase, fosfatases, topoisomerasas, enzimas, e ceclinas. Por exemplo, os agentes citotóxicos incluem, mas não estão limitados a, doxorrubicina, daunorrubicina, idarrubicina, aclarrubicina, zorrubicina, mitoxantrona, epirrubicina, carrubicina, nogalamicina, menogaril, pitarrubicina, valrubicina, cytarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, azocitidina, doxifluridina,
15 pentostatin, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougertin, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbazona, metotrexato,
20 fluorouracil, etoposídeo, taxol, análogos do taxol, platinas tais como cisplatinas e carbo-platinas, mitomicina, tiotepa, taxanos, vincristina, daunorrubicina, epirrubicina, actinomicina, autramicina, azoserinas, bleomicinas, tamoxifen, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemisterlinas, esperamicinas e maitansinóides.

25 Em aspectos particulares da presente invenção, os conjugados molécula alvo/fármaco caracterizados usando os métodos aqui descritos compreendem uma porção de um fármaco antibiótico tal como uma caliqueamicina, chamada também de complexo LL-E33288, por exemplo, a gama-caliqueamicina ou um derivado menos potente, a N-acetil gama-caliqueamicina. Veja Patente US Nº 4.970.198. Exemplos adicionais das caliqueamicinas apropriadas para o uso em candidatos molécula alvo/fármaco
30 são descritos nas Patentes US Nº 4.671.958; 5.053.394; 5.037.651;

5.079.233; e 5.108.912; que são aqui incorporados em suas totalidades. Os análogos do dissulfeto de caliqueamicina podem também ser usados, por exemplo, os análogos descritos nas Patentes US Nº 5.606.040 e 5.770.710, que são cada uma aqui incorporadas em suas totalidades. As técnicas re-
5 presentativas para a preparação de conjugados anticorpo/caliqueamicina tal como determinado no Exemplo 1, são descritos na Patente US Nº 5.712.374; 5.714.586; 5.773.001; e 5.877.296; na Publicação de Patente US Nº 2004-0082764-A1 e 2006-0002942-A1; e na Publicação PCT Nº WP 2005/089809; que são cada uma aqui incorporadas em suas totalidades.

10 Os agentes imunomoduladores que podem ser usados para preparar conjugados molécula alvo/fármaco incluem os anti-hormônios que obstruem a ação de hormônio em tumores e os agentes imunossuppressores que evitam a produção da citocina, sub-regulam a expressão do auto-
15 hormônios incluem os anti-estrogênios que incluem, por exemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazóis que inibem a aromatase, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY 117018, onapnstona e toremifeno; e antiandrogê-
nios tais como a flutamida, a nilutamida, a bicalutamida, o leuprolidio e a gos-
20 serelina; e agentes antiadrenais. Os agentes imunossuppressores representa-
tivos incluem as 2-amino-6-aryl-5-pirimidinas substituídas, a azotioprina, a ciclofosfamida, a bromocriptina, o danazol, a dapsona, o glutaraldeído, anti-
corpos antiidiotípicos para antígenos MHC e fragmentos MHC, ciclosporina
A, esteróides tais como glicocorticoesteróides, citocina ou antagonistas dos
25 receptores da citocina (por exemplo, anticorpos anti-interferon, anticorpos
anti-IL10, anticorpos anti-TNF α , anticorpos anti-IL2), estreptoquinase, TGF β ,
rapamicina, receptor da célula T, fragmentos do receptor da célula T, e anti-
corpos do receptor da célula T.

Os agentes antiangiogênicos representativos incluem inibidores da formação de vasos sanguíneos, por exemplo, inibidores do farnesiltrans-
30 ferase, inibidores da COX-2, inibidores de VEGF, inibidores do bFGF, inibi-
dores da esteróide sulfatase (por exemplo, bis-sulfamato de 2-
metoxioestradiol (2-MeOE2bisMATE)), interleucina-24, trombospondina, pro-

teínas da metalospondina, interferons da classe I, interleucina 12, protamina, angiostatina, laminina, endostatina, e fragmentos da prolactina.

Os agentes antiproliferativos e os agentes pro-apoptóticos incluem ativadores da PPAR-gama (por exemplo, ciclopentenona prostaglandinas (cyPGs)), retinóides, triterpinóides (por exemplo, cicloartano, lupano, ursano, oleanano, friedelano, damarano, cucurbitacina e triterpenóides do limonóide), inibidores do receptor da EGF (por exemplo, HER4), rampamicina, CALCITRIOL[®] (1,25-diidroxicolecalciferol (vitamina D)), inibidores da aromatase (FEMARA[®] (letrozona)), inibidores da telomerase, quelantes do ferro (por exemplo, 3-aminopiridina-2-carboxaldeído da tiosemicarbazona (Triapine)), apoptina (proteína viral 3 - VP3 do vírus da anemia da galinha), inibidores da Bcl-2 e da bcl-X(L), TNF-alfa, ligante FAS, ligante de indução da apoptose relacionado com a TNF (TRAIL/Apo2L), ativadores da sinalização da TNF-alfa/do ligante FAS/do ligante de indução da apoptose relacionado com a TNF (TRAIL/Apo2L), e inibidores de sinalização da via da sobrevivência da PI3K-Akt (por exemplo, UCN-01 e geldanamicina).

Os agentes quimioterapêuticos representativos incluem agentes de alquilação tais como a tiotepa e a ciclosfosfamida; sulfonatos de alquilação tais como bussulfan, improssulfan e pipossulfan; aziidinas tais como a benzodopa, a carboquona, a meturedopa, e a uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo a altretamina, a trietilenomelamina, a trietilenofosforamida, a trietilenotiofosforamida e a trimetilolomelamina; mostardas do nitrogênio tais como a clorambucil, a clornafazina, a colofosfarnida, estramustina, ifosfamida, mequioretamina, cloridrato do óxido de mequioretamina, melfalan, novembiquina, fenésterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda da uracila; nitrosouréias tais como o carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tais como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azasserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicinas, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelami-

cina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex,
 zinostatina, zorrubicina; antimetabólitos tais como o metotrexato e a 5-
 fluorouracila (5-FU); análogos do ácido fólico tais como a denopterinina, meto-
 5 trexato, pteropterina, trimetrexato; análogos da purina tais como o fludarabi-
 na, 6-mercaptipurina, tiamiprina, tioguanina; análogos da pirimidina tais co-
 mo a ancitabina, azacitidina, 6-azouridina, carmofur, citarabina, didesoxiuri-
 dina, doxiluridina, encitabina, floxuridina, 5-EU; androgênios tais como a
 calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testo-
 lactona; antiadrenais como a aminoglutatimida, mitotano, trilostano; reabas-
 10 tecedor de ácido fólico tal como o ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo da
 aldofosfarnida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno;
 edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato do elip-
 tínio; etoglucídio; nitrato de gálio; hidroxiuréia; lentinan; lonidamina; mitogua-
 zona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubi-
 15 cina; ácido podofilínico; 2-etilidrazida; procarbazona; razoxano; sizofirano;
 espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2'-triclortrietilamina;
 uretano; vindesina; dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipo-
 bromano; gacitosina; arabinosídeo (Ara-C); ciclofosfamida; tiotepa; taxóides,
 por exemplo paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncologia de Prince-
 20 ton, Nova Jersey) e doxetaxel (TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer de An-
 tony, França); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; meto-
 trexato; análogos da platina tais como a cisplatina e a carboplatina; vinblasti-
 na; platina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vin-
 cristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposídeo; daunomicina; aini-
 25 nopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor da topoisomerase RFS
 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinóico; esperamicinas; e capeci-
 tabina.

Os agentes terapêuticos adicionais que podem ser conjugados a
 moléculas alvo e que podem ser caracterizados usando os métodos aqui
 30 descritos incluem agentes fotossensibilizantes (Publicação de Patente US Nº
 2002/0197262 e Patente US Nº 5.952.329) para a terapia fotodinâmica; par-
 tículas magnéticas para termoterapia (Publicação de Patente US Nº

2003/0032995); agentes de ligação, tais como peptídios, ligantes, ligantes de aderência celular, etc, e pró-fármacos tais como os pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfato, pró-fármacos contendo peptídio, pró-fármacos contendo β -lactama, pró-fármacos contendo fenoxiacetamida substituída ou pró-fármacos contendo fenilacetamida substituída, o 5-fluorocitosina e outros pró-fármacos da 5-fluorouridina que podem ser convertidas ao fármaco livre citotóxica mais ativa.

II. Farmacocinéticas dos conjugados molécula alvo/fármaco.

10 A presente invenção fornece métodos de determinar o suprimento do fármaco de uma molécula alvo, por exemplo, determinar se a reação de conjugação conseguiu um nível de suprimento do fármaco compreendendo uma dose eficaz, isto é, uma quantidade suficiente de conjugado molécula alvo/fármaco para promover uma resposta biológica desejada, e para manter a consistência batelada-por-batelada de conjugados molécula alvo/fármaco comercialmente produzidos. Para avaliar a liberação do fármaco ou a estabilidade dos conjugados molécula alvo/fármaco, o suprimento do fármaco também pode ser avaliado depois da administração a um paciente, por exemplo, usando uma amostra de sangue do paciente.

20 Tal como aqui descrito, uma quantidade de conjugados molécula alvo/fármaco pode ser calculada a partir das determinações separadas de (i) uma quantidade de moléculas alvo e de (ii) uma quantidade de conjugados molécula alvo/fármaco na mesma amostra. As etapas (i) e (ii) são mais completamente descritas abaixo sob os subtítulos ILA e ILB, respectivamente. Veja também a Figura 1. Resumidamente, o método inclui uma medida de duas respostas consecutivas. Uma primeira resposta determina o número de unidades de ressonância após ter contactado uma amostra que contenha os conjugados molécula alvo/fármaco sobre um dispositivo sensível à massa, tal como um chip BIACORE[®], com o alvo imobilizado reconhecido pela molécula alvo do conjugado. Esta resposta é proporcional à soma da molécula alvo livre (não-conjugada) e conjugada na amostra. Uma segunda resposta é obtida depois que seqüencialmente se contactar um agente de liga-

25

30

ção do fármaco com as moléculas alvo livres (não-conjugadas) e conjugadas presas ao alvo imobilizado no mesmo dispositivo sensível à massa. Esta segunda resposta é proporcional à quantidade do fármaco presente na amostra na forma de conjugado molécula alvo/fármaco.

5 De acordo com os métodos descritos, qualquer técnica adequada de detecção de massa pode ser usada. As tecnologias representativas conhecidas na técnica incluem métodos piezoelétricos, óticos, termo-óticos, da superfície da onda acústica (SERRA), bem como métodos eletroquímicos, tais como métodos potenciométrico, voltamétrico, condutimétrico, amperimétrico e da capacitância.

10 Os métodos óticos que podem ser usados incluem métodos para detectar a concentração de massa superficial (ou o índice de refração), tais como métodos óticos de reflexão, incluindo métodos internos e externos de reflexão, por exemplo, elipsometria e espectroscopia de onda evanescente (EWS), esse último método incluindo a ressonância do plasmônio da superfície (SPR), refratometria angular de Brewster, refratometria angular crítica, reflexão total frustrada (FTR), elipsometria de onda evanescente, reflexão interna total dispersada (STIR), sensores óticos da guia da onda, onda evanescente baseada em imagem, tal como a imagem de resolução do ângulo crítico, imagem de resolução do ângulo de Brewster, imagem de resolução do ângulo de SPR, etc., assim como os métodos baseados na fluorescência evanescente (TIRF) e na fosforescência.

25 Por exemplo, para se estimar a constante de equilíbrio de uma molécula alvo em uma amostra, a seguinte técnica de detecção de massa pode ser usada. Primeiramente, uma série de concentrações (por exemplo, 0, 100 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, e 1000 ng/ml) da molécula alvo é preparada e injetada seqüencialmente em um biossensor possuindo um chip sensor operacionalmente associado ao mesmo, sendo que o dito chip sensor possui uma referência da superfície de detecção e de pelo menos uma referência da superfície de detecção com alvo imobilizado. São 30 medidas as respostas relativas dos níveis de ligações no estado de equilíbrio para cada concentração da molécula alvo. Devido às contribuições de volu-

me do índice de refração dos aditivos solventes no tampão de corrida do biossensor, pode ser calculado um fator de correção (através de procedimentos conhecidos de calibração) a ser aplicado para produzir respostas relativas corrigidas. As respostas relativas corrigidas para cada concentra-

5 ção de molécula alvo são avaliadas então matematicamente tal como é apreciado por aqueles versados na técnica de estimativa da constante de equilíbrio da molécula alvo.

Em um aspecto particular da presente invenção, a técnica de detecção de massa é a ressonância do plasmônio da superfície, que pode ser executada usando um equipamento da BIACORE[®] (Biacore AB da Upsália, Suécia). O aparelho e o fundamento teórico estão descritos em Johnson et al., *BioTechniques*, 1991, 11:620-627. Esta técnica envolve a imobilização de um primeiro associador de ligação de um par ligante a um chip sensor, fazer o contacto do chip sensor com uma amostra contendo um segundo

10 associador de ligação do par ligante, e medindo então uma alteração resultante nas características óticas de superfície do chip sensor.

Em geral, um suporte sólido compreende um revestimento matriz de hidrogel ligado à parte superior da superfície do suporte sólido, em que o revestimento matriz de hidrogel possui diversos grupos funcionais.

20 Para uso com um instrumento de BIACORE[®], o suporte sólido está preferivelmente na forma de um chip sensor, em que o chip sensor tem um elétron metálico livre interposto entre a matriz do hidrogel e a superfície superior. Os metais com elétrons livres adequados para essa finalidade incluem o cobre, a prata, o alumínio e o ouro.

Em um aspecto particular da presente invenção, o método pode compreender as etapas de: (a) fornecer um suporte sólido compreendendo uma superfície na qual um alvo é imobilizado; (b) fornecer uma amostra compreendendo diversos conjugados molécula alvo/fármaco; (c) contactar a amostra com o alvo imobilizado na superfície do suporte sólido; (d) detectar

25 a formação na superfície do suporte sólido de um primeiro complexo de ligação da (i) molécula alvo e (ii) alvo na superfície do suporte sólido, no qual a

30 formação do primeiro complexo de ligação causa uma primeira alteração

mensurável na propriedade da massa do suporte sólido indicando uma quantidade de moléculas alvo na amostra; (e) contactar o primeiro complexo de ligação com um anticorpo antifármaco ou antifrimento de ligação do fármaco; e (f) detectar a formação na superfície do suporte sólido de um segundo complexo de ligação do (i) anticorpo antifármaco ou antifrimento de ligação do fármaco com o (ii) primeiro complexo de ligação, no qual a formação do segundo complexo de ligação causa uma segunda alteração mensurável na propriedade da massa do suporte sólido indicando uma quantidade de conjugados molécula alvo/fármaco na amostra.

10 Em um outro aspecto de acordo com a presente invenção, um método de determinação de uma quantidade média de suprimento do fármaco através de um anticorpo em uma amostra de conjugados molécula alvo/fármaco pode compreender as etapas de: (a) fornecer um suporte sólido em que os conjugados molécula alvo/fármaco de uma amostra estão ligados; (b) determinar a quantidade de fármaco na amostra medindo uma alteração na propriedade da massa de um suporte sólido quando da ligação de um anticorpo antifármaco, ou antifrimento de ligação do fármaco, aos conjugados molécula alvo/fármaco presos na superfície do suporte sólido; e (c) calcular uma quantidade média de fármaco por conjugados molécula alvo/fármaco dividindo a quantidade do fármaco em (d) pela quantidade de moléculas alvo na amostra. Quando considerado como uma função do tempo durante a administração a um paciente, este método é útil para avaliar a estabilidade da meia-vida circulante de um conjugado molécula alvo/fármaco com o ligante.

25 Usando os métodos descritos, os conjugados molécula alvo/fármaco foram detectados em amostras de soro em um nível de 100 a 1.000 ng/ml de molécula alvo. Tal como descritos nos Exemplos 4 e 5, os valores do PK dos conjugados molécula alvo/fármaco foram, de forma reproduzida, determinados em amostras individuais. A presença de um tumor expressando um alvo reduziu a meia-vida circulante de um conjugado molécula alvo/fármaco com especificidade para o alvo, mas não teve nenhum efeito no meia-vida circulante de um conjugado molécula alvo/fármaco pos-

suindo especificidade diferente. Compare as Figuras 5B e 3B, respectivamente. A redução da meia-vida circulante pode ser atribuída à retenção do conjugado molécula alvo/fármaco na presença de um alvo adequado.

5 IIA. Métodos de determinação de uma Quantidade de Moléculas alvo em uma Amostra Compreendendo os Conjugados Molécula alvo/Fármaco.

A presente invenção fornece métodos para a determinação de uma quantidade de moléculas alvo em uma amostra compreendendo diversos conjugados molécula alvo/fármaco. Em um aspecto particular da presente invenção, o método compreende as etapas de (a) fornecer um suporte
10 sólido compreendendo uma superfície na qual um alvo é imobilizado; (b) fornecer uma amostra compreendendo diversos conjugados molécula alvo/fármaco; (c) contactar a amostra com o alvo imobilizado na superfície do suporte sólido; e (d) detectar a formação de um complexo de ligação das (i) moléculas alvo na amostra com (ii) o alvo na superfície do suporte sólido, em
15 que a formação do complexo de ligação causa uma alteração mensurável na propriedade da massa do suporte sólido.

As amostras representativas que podem ser usadas de acordo com os métodos descritos incluem a preparação de conjugados de molécula alvo/fármaco, isto é, uma amostra compreendendo uma reação de conjuga-
20 ção entre uma molécula alvo e um fármaco, que pode incluir uma molécula alvo conjugada, molécula alvo não-conjugada e o fármaco livre. Como amostras obtidas de um paciente após a administração de anticorpos ao paciente também podem ser usados, por exemplo, o sangue, o soro, ou amostras de urine. A amostra pode compreender um volume líquido mínimo, tal como
25 menos do que aproximadamente 100 μ l, ou menos do que aproximadamente 50 μ l, ou menos do que aproximadamente 25 μ l, ou menos do que aproximadamente 10 μ l, ou menos do que aproximadamente 5 μ l. Maiores volumes de amostra podem ser usados aumentar a sensibilidade. Uma amostra também pode compreender um extrato líquido preparado de uma amostra de
30 tecido, tal como um tumor. Por exemplo, uma amostra pode ser preparada de um carcinoma escamoso/adenomatoso de pulmão (carcinoma do pulmão da célula não pequena), do carcinoma invasivo do seio, do carcinoma colo-

retal, do carcinoma gástrico, do carcinoma cervical escamoso, do adenocarcinoma endometrial invasivo, do carcinoma invasivo do pâncreas, do carcinoma ovariano, do carcinoma vesical escamoso, do coriocarcinoma, ou dos outros carcinomas dos brônquios, dos seios, do cólon, do reto, do estômago, do colo do útero, do endométrio, do pâncreas, do ovário, do córion, e da vesícula seminal.

IIB. Métodos de determinação de uma Quantidade de fármaco em uma Amostra Compreendendo Conjugados de Molécula alvo/Fármaco.

Para determinação de uma quantidade de fármaco em uma amostra, conjugados molécula alvo/fármaco são ligados a um chip de detecção de massa, e um agente de ligação do fármaco que se liga especificamente à porção do fármaco do conjugado molécula alvo/fármaco é usado para detectar os conjugados. Um agente de ligação do fármaco pode compreender um anticorpo antifármaco ou antifrimento de ligação do fármaco. Os agentes de ligações representativos adicionais incluem proteínas, peptídeos, miméticos do peptídeo, ácidos nucleicos do peptídeo (PNAs), ligantes, ou qualquer outra molécula que seja capaz de se ligar especificamente a uma porção do fármaco tal como descrito aqui.

Por exemplo, o método pode compreender as etapas de (a) fornecer um suporte sólido compreendendo uma superfície em que um primeiro complexo de ligação é imobilizado, em que o complexo de ligação compreende (i) um alvo tal como aqui descrito e (ii) um conjugado molécula alvo/fármaco ligado ao alvo; (b) contactar um anticorpo antifármaco ou antifrimento de ligação do fármaco com o primeiro complexo de ligação imobilizado na superfície do suporte sólido; e (c) detectar a formação de um segundo complexo de ligação do (i) anticorpo antifármaco ou antifrimento de ligação do fármaco e do (ii) primeiro complexo de ligação na superfície do suporte sólido, em que a formação do complexo causa uma alteração mensurável na propriedade da massa do suporte sólido indicando uma quantidade de conjugados da molécula alvo/fármaco, na amostra.

Alternativamente, o método pode compreender as etapas de (a) fornecer um suporte sólido compreendendo uma superfície em que um anti-

corpo antifármaco ou antifrágimento de ligação do fármaco é imobilizado; (b) contactar uma amostra compreendendo conjugados molécula alvo/fármaco com o anticorpo antifármaco ou ou antifrágimento de ligação do fármaco imobilizado na superfície do suporte sólido; e (c) detectar uma alteração mensurável na propriedade de massa do suporte sólido indicando uma quantidade de conjugados molécula alvo/fármaco, na amostra.

Um anticorpo que é usado para detectar a porção do fármaco do conjugado molécula alvo/fármaco pode ser qualquer anticorpo mostrando uma ligação específica, isto é, se ligando preferivelmente ao fármaco quando o fármaco é apresentada em uma amostra que contem outros antígenos. O anticorpo pode ser policlonal ou monoclonal. Os anticorpos antifármaco possuindo baixas falhas nas taxas fornecem a maior sensibilidade. Quando se estiver usando os anticorpos antifármaco possuindo moderadas falhas nas taxas, as correções para o ruído de fundo podem ser usadas para quantificar os conjugados molécula alvo/fármaco com sensibilidade reduzida.

Os métodos para preparar e caracterizar os anticorpos antifármaco são bem-conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. As técnicas adicionais e os reagentes úteis para gerar e selecionar uma biblioteca da exposição de anticorpos podem ser encontrados, por exemplo, na Patente US Nº 5.223.409, e nos Pedidos Internacionais de Publicação de Patente PCT Nº. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690, e WO 90/02809.

Resumidamente, um anticorpo policlonal é preparado imunizando um animal com um antígeno compreendendo um fármaco tal como aqui descrita, e coletando o anti-soro daquele animal imunizado. Uma ampla variedade de espécies animais pode ser usada para a produção dos anti-soros, por exemplo, coelhos, camundongos, camundongos, hamster, porcos-da-índia, cabras, e cavalos.

Como é bem-conhecido na técnica, o antígeno pode ser ligado com um veículo, tal como uma hemocianina de molusco ciclídeo (KLH) e albuminas do soro (por exemplo, BSA), para melhorar a imunogenicidade.

As técnicas para conjugar um antígeno a um polipeptídeo do veículo são bem-conhecidas na técnica e incluem o glutaraldeído, o éster m-maleimidobencóil-N-hidroxissuccinimida, a carbodiimida e a benzidina bis-biazotada. A imunogenicidade de um antígeno também pode ser realçada pelo uso de adjuvantes, por exemplo, do adjuvante completo de Freund, de adjuvantes incompletos de Freund, e do adjuvante hidróxido de alumínio.

A quantidade de imunógeno usada para a produção de anticorpos policlonais varia dependendo da natureza do antígeno, do animal usado para imunização e da via de administração (por exemplo, subcutânea, intramuscular, intradérmica, intravenosa ou intraperitoneal). A produção de anticorpos policlonais é monitorada nas amostras de sangue do animal imunizado em vários pontos depois da imunização. Quando é obtido um título desejado de anticorpo, o animal imunizado é sangrado e o soro é isolado e armazenado.

Um anticorpo monoclonal antifármaco para uso nos métodos aqui descritos pode rapidamente ser preparado com o uso de técnicas bem-conhecidas tais como aquelas exemplificadas na Patente US Nº 4.196.265. Por exemplo, os camundongos ou camundongos são imunizados com um fármaco por um período suficiente para obter uma resposta imune, e as células esplênicas do animal imunizado são então fundidas com as células imortais do mieloma. As células fundidas são separadas da mistura de células progenitoras não-fundidas, por exemplo, pela adição novamente de agentes que obstruem a síntese do nucleotídeo aos meios de cultura (por exemplo, aminopterina, metotrexato e azoserina). Os hibridomas individuais são cultivados e os sobrenadantes são testados para a reatividade com o antígeno do fármaco. Os clones selecionados podem ser propagados indefinidamente como uma fonte de anticorpo monoclonal.

Como forma de um exemplo específico, para produzir um anticorpo da antifármaco tal como descrito aqui, os camundongos são injetados intraperitonealmente com aproximadamente de 1 a 200 µg de um antígeno compreendendo um fármaco de um conjugado molécula alvo/fármaco. As células do linfócito B são estimuladas a crescer injetando-se o fármaco em

associação com um adjuvante tal como o adjuvante de Freund completo. Conforme seja necessário, camundongos são ativados pela injeção com uma segunda dose do fármaco misturado com o adjuvante de Freund incompleto. Algumas semanas após a segunda injeção, os camundongos são cauda sangrada e o soro é titulado por imunoprecipitação. As etapas de ativação e de titulação são repetidas até que seja conseguido um título adequado. O baço do camundongo é removido, os linfócitos do baço são isolados, e as células do mieloma são combinadas com os linfócitos do baço sob condições apropriadas para a fusão celular. As condições da fusão incluem, por exemplo, a presença do polietileno glicol. As células fundidas são separadas das células não-fundidas do mieloma pelo cultivo em um meio de seleção tal como o meio HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Os híbridos resultantes são selecionados para a produção de anticorpos antifármaco. Os clones selecionados são cultivados em volumes elevados para se conseguir quantidades adequadas de anticorpos. Os anticorpos podem ser purificados por cromatografia de afinidade ou por outros métodos, tal como é conhecido na técnica.

EXEMPLOS.

Os seguintes exemplos foram incluídos para ilustrar modalidades da presente invenção. Determinados aspectos desses exemplos são descritos em termos das técnicas e dos procedimentos encontrados ou contemplados pelos atuais co-inventores para trabalhar bem na prática da presente invenção. Estes exemplos ilustram práticas padrão dos laboratórios dos co-inventores. À luz da presente descrição e a nível geral da habilidade na técnica, aqueles que são versados apreciarão que os seguintes exemplos possuem a intenção de serem somente exemplificações e que as diversas alterações, modificações, e alterações podem ser empregadas sem se fugir do alcance da presente invenção.

Exemplo 1.

30 Preparação dos Conjugados Anticorpo/Caliqueamicina.

A gemtuzumab ozogamicina e a inotuzumab ozogamicina são conjugados da caliqueamicina dos anticorpos anti-CD33 e anti-CD22,

hP67.6 e G5/44, respectivamente. A gemtuzumab ozogamicina é o nome genérico para o fármaco comercial MYLOTARG® e também é referida como hP67.6-AcBut-CalichDMH. O conjugado anti-CD22/caliqueamicina, inotuzumab ozogamicina, também conhecido como G5/44-acBut-CalichDMH, está atualmente na fase I dos testes clínicos. Para obter estes conjugados, o hP67.6 e o G5/44 foram ligados a N-acetil gama caliqueamicina dimetil hidrazida com o ligante ácido lábil (ácido 4(4'-acetilfenóxi)butanóico) (AcBut). Os anticorpos foram supridos em uma densidade de aproximadamente 35 µg de caliqueamicina por mg de hP67.6 e aproximadamente 73 µg de caliqueamicina por mg de G5/44. Os conjugados anti-Lewis Y/caliqueamicina e anti-5T4/caliqueamicina foram similarmente preparados e usados nos ensaios descritos.

Exemplo 2.

Administração dos Conjugados Anticorpo/Caliqueamicina.

A linhagem da célula Ramos (CRL-1923) foi obtida da coleção da cultura do tipo americano (ATCC). Ramos é uma linhagem celular CD22⁺, CD33⁻ derivada da célula-B do linfoma humano. As células foram mantidas em culturas de suspensão em RPM11640 suplementadas com HEPES 10 mM, piruvato de sódio 1 mM, glicose 0,2 % (p/v), penicilina G sódio 100 U/ml, sulfato de estreptomicina 100 µg/ml e 10% (v/v) de soro bovino fetal.

Os camundongos pelados Balb/c com idades de 16 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts) foram irradiados com 400 rad de raios gama. As células Ramos ($10^7/200 \mu\text{l}$) foram injetadas no flanco direito de cada camundongo. Após 8 dias, 10 camundongos com um tumor do tamanho de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^3$ ($\pm s=0,16$) foram selecionados. Quatro grupos do tratamento foram criados: (1) os camundongos portadores de tumor tratados com hP67.6-AcBut-CalichDMH, (2) os camundongos livres de tumor tratados com hP67.6-AcBut-CalichDMH, (3) os camundongos portadores de tumor tratados com o G5/44-AcBut-CalichDMH, e (4) os camundongos livres de tumor tratados com o G5/44-AcBut-CalichDMH. Dois dias antes da administração dos conjugados anticorpo/caliqueamicina, uma amostra do sangue de 5 µl foi retirada de cada ca-

mundongo. Uma única dose de 150 μ l do conjugado anticorpo/caliqueamicina (3 μ d de caliqueamicina por camundongo) foi injetada na veia lateral da cauda. Amostras de sangue de exatamente 5 μ l foram retiradas em 24, 48, 72, e 96 horas depois disso. Para obter a reprodutibilidade de amostragens de pequenos volumes, os camundongos foram mantidos sob uma lâmpada do aquecimento até que as veias da cauda se tornaram visíveis. A cauda foi desinfetada com álcool isopropílico a 70%, e a veia lateral da cauda foi perfurada com uma agulha. A gota do sangue resultante foi aspirada então com um capilar montado em um micropipetador (Drummond of Broomall, Pensilvânia) pré-ajustado para um volume de aspiração de 5 μ l. Esta amostra de sangue foi transferida imediatamente para um tubo de ensaio contendo 195 μ l da seguinte mistura: 0,01 M HEPES (pH 7,4); 0,15 M NaCl, EDTA a 3 mM, 0,005% tensoativo P20 (tampão de HBS-EP, disponíveis pela Biacore de Upsália, Suécia).

15 Exemplo 3.

Ensaio Tipo Sanduíche para Detecção da Ressonância do Plasmônio.

Um ensaio tipo sanduíche para detecção da ressonância do plasmônio foi desenvolvido para determinar em uma amostra do soro (1) uma quantidade de moléculas alvo e de conjugados molécula alvo/fármaco em uma amostra, e (2) uma quantidade de fármaco presente nos conjugados de molécula alvo/fármaco da mesma amostra. O princípio deste método é ilustrado na Figura 1. O ensaio permite uma avaliação da liberação dos conjugados molécula alvo/fármaco. O método não-discrimina entre uma redução do fármaco em todas as moléculas conjugadas e a geração de uma fração de anticorpo não-conjugado.

As análises descritas aqui foram executadas em um equipamento da BIACORE® (Biacore International AB da Upsália, Suécia) usando conjugados de anticorpo/caliqueamicina. O sistema de detecção deste equipamento se baseia na medida das alterações do índice de refração causadas pela interação das macromoléculas em chips bio-sensores. Veja por exemplo, Johns et al., *J. Immunol. Methods*, 1993, 160(2): 191-198; Karlson et al., *J. Immunol. Methods*, 1991, 145(1-2):229-240.

Os antígenos foram imobilizados na superfície de um chip biosensor CM5 em uma densidade de 4.000 a 9.000 unidades de ressonância/célula de fluxo. O chip foi ativado pelo reagente de acoplamento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida-HCl/N-hidroxissuccinimida em uma taxa de fluxo de 5 µl/minuto por 6 minutos, seguidos pela adição dos antígenos. Os antígenos de Lewis-BSA foram supridos contactando o chip com 50 µg/ml de proteína em uma solução de 10 mM de acetato de sódio (pH 4,0 a 4,5) em uma taxa de fluxo de 5 µl/minuto por 6 minutos. Os CD33 ou CD22Fc foram ligados covalentemente aos chips CM5 pelo contato do chip com 0,1 mg/ml de proteína em uma solução a 10 mM de acetato de sódio (pH 5) em uma taxa de fluxo de 2 µl por o minuto por 30 minutos. O chip foi então lavado com HBS-EP contendo 300 mM NaCl.

Depois da imobilização do antígeno em um chip CM5, as curvas de calibração foram estabelecidas para cada antígeno. Como um resultado representativo, as Figuras 2A-2B mostram a correlação entre a concentração de amostras padrão e o número de unidades de ressonância quando da ligação do conjugado anti-CD33/caliqueamicina hP67.6-acBut-CalichDMH. Um coeficiente de correlação de aproximadamente 1,0 permite a determinação exata da quantidade total de anticorpo e da quantidade de caliqueamicina ligada ao anticorpo. Usando as curvas de calibração, foi determinada a concentração da porção anticorpo de um conjugado de anticorpo/fármaco no soro.

Depois disso pelo contato do chip com um anticorpo anticaliqueamicina, a quantidade de caliqueamicina presente na amostra do soro foi também determinada. Tal como demonstrado pela ausência de uma segunda resposta na Figura 2B, o anticorpo não-conjugado nas mesmas concentrações não reage ao anticorpo anticaliqueamicina. Este resultado fornece a evidência para a especificidade da segunda resposta para a presença da caliqueamicina no anticorpo.

A resposta após a ligação do conjugado ao CD33 por si próprio (hP67.6-AcBut-CalichDMH) bem como seguido por uma resposta secundária (hP67.6-AcBut-CalichDMH + anticaliqueamicina) foi linear ($r^2=0,9996$ e

$r^2=0,9994$, respectivamente) para uma faixa de concentração de conjugado entre 0 e 500 ng/ml. A diferença dessas respostas (isto é, as unidades de ressonância atribuíveis à ligação do anticaliqueamicina) também é linear ($r^2=0,9947$) dentro desta faixa. Os coeficientes da regressão por mínimos quadrados dessas funções foram maiores do que 0,99 quando foi usada uma faixa da concentração de 0 a 1000 ng/ml. A interpolação usando uma equação quadrática de unidades de ressonância traçada em função da concentração permite a determinação exata da concentração do conjugado anticorpo/fármaco em uma amostra contendo entre 0 e 1000 ng/ml do conjugado de anticorpo/fármaco. Uma estratégia similar foi usada para estabelecer as curvas de calibração que descrevem (1) a relação entre as unidades de ressonância e a concentração de anticorpo G5/44 anti-CD22 e 65/44-AcBut-CaliChDMH (ver Figura 4); e (2) a relação entre as unidades de ressonância e a concentração do anticorpo G193 anti-Lewis Y e CMD193, um conjugado com a caliqueamicina do mesmo. Essas relações foram também melhor descritas ($r^2>0,99$) por uma equação quadrática para uma faixa da concentração entre 0 e 1000 ng/ml.

Exemplo 4.

Propriedades Farmacocinética dos Conjugados de Anti-CD33/Caliqueamicina.

As propriedades farmacocinética da hP67.6-AcBut-CalichDMH foram determinadas em camundongos portadores de tumor e livres de tumor. Cinco animais foram usados para cada grupo. Os camundongos portadores de tumor tiveram um peso corporal médio de 19 g (desvio padrão = 1 g) e tiveram tumores Ramos xenoenxertados com um volume médio de 528 mm³ (desvio padrão 102 mm³). Os camundongos livres de tumor tiveram um peso corporal médio de 20 g (desvio padrão = 1 g).

A Figura 3A mostra a concentração de hP67.6-AcBut-CalichDMH no plasma de camundongos pelados em vários pontos de tempo que se seguiram à injeção intravenosa de uma única dose do conjugado de anticorpo/fármaco. Uma dose de caliqueamicina de 3 µg foi administrada a cada camundongo. A dose de anticorpo é indicada como de µg/kg de massa

corporal. A concentração do conjugado de anticorpo/fármaco no plasma foi calculada pela correção para um hematócrito normal de 45%, e supôs-se que nenhum conjugado de anticorpo/fármaco estivesse ligado à fração celular. Uma dose de caliqueamicina de 3 µg, que foi fornecida como 86 µg de conjugado do anticorpo/fármaco possuindo 35 µg de caliqueamicina por mg de anticorpo, é administrada em um volume do sangue de 1,5 ml (volume aproximado do sangue de um camundongo de 20 g). Conseqüentemente, teoricamente se anteciparia 105 µg/ml como uma concentração máxima. Baseado em um volume de amostra do sangue de 5 µl, a concentração experimental determinada do conjugado de anticorpo/fármaco após 20 minutos foi de aproximadamente 80 µg/ml.

As quantidades de conjugado anticorpo/fármaco que foram administradas a cada camundongo variaram dependendo da massa real do corpo do animal. Dentro de uma faixa de 4,1 a 4,5 mg de conjugado anticorpo/fármaco por quilograma, a dose administrada não foi diretamente proporcional à concentração máxima do conjugado no plasma. Além disso, os dados não indicaram que a variação da dose foi responsável por variações na meia-vida em circulação. Uma meia-vida excepcionalmente elevada na circulação foi observada em um único camundongo que recebeu uma dose de 5 mg do conjugado anticorpo/fármaco por quilograma.

A quantidade de hP67.6 conjugada à caliqueamicina tem uma meia-vida mais curta na circulação do que o anticorpo não-conjugado. Isto é ilustrado na Figura 3C, mostrando uma concentração consistentemente decrescente da caliqueamicina conjugada (Resposta 2) como uma fração do anticorpo-anticorpo-porção de hP67.6-AcBut-CalichDMH (Resposta 1). A reprodutibilidade da redução da caliqueamicina total ligada ao anticorpo não foi influenciada pela presença do tumor Ramos CD22⁺.

Exemplo 5.

Propriedades Farmacocinéticas dos Conjugados Anti-CD22/Caliqueamicina.

As propriedades farmacocinéticas do G5/44-AcBut-CalichDMH foram determinadas em camundongos portadores de tumor e em camundongos livres de tumor. Três camundongos portadores de tumor tiveram um

peso corporal médio de 19 g (desvio padrão = 1 g) e tiveram tumores Ramos xenoenxertados com um volume médio de 1276 mm³ (desvio padrão 398 mm³). Seis camundongos livres de tumor tiveram um peso corporal médio de 20 g (desvio padrão = 1 g). A administração de conjugados anti-
5 CD22/caliqueamicina e o ensaio de ressonância do plasmônio da superfície foi realizado tal como descrito nos Exemplos 2, 3, e 4.

As curvas de calibração que descrevem a relação entre unidades de ressonância e a concentração do anticorpo G5/44 e do conjugado de G5/44-AcBut-CalichDMH são mostradas na Figura 4. A relação foi melhor
10 descrita ($r > 0,99$) por uma equação quadrática para uma faixa da concentração entre 0 e 1.000 ng/ml. Ver a Figura 4. Tal como para o hP67.6 não-conjugado, não foi observada uma resposta para a caliqueamicina livre com o G5/44 não-conjugado.

A Figura 5A mostra uma concentração decrescente da porção anticorpo da G5/44-acBut-CalichDMH no plasma de camundongos portadores de tumor e não-portadores de tumor. As concentrações da porção de anticorpo da G5/44-AcBut-CalichDMH (Figura 5A) e a quantidade de caliqueamicina ligada a G5/44 (Figura 5B) declinaram mais rapidamente em camundongos portadores de tumor. Isto foi refletido pela diminuição da
20 meia-vida circulante da G5/44-acBut-CalichDMH. Ver a Tabela I. A presença de um tumor que expressasse o alvo CD22 aumentou a remoção do conjugado do plasma. O declínio da concentração da caliqueamicina em função do tempo foi idêntico nos camundongos portadores de tumor e não-portadores de tumor (Figura 5C), indicando que a presença do tumor não
25 influenciou na liberação da caliqueamicina da porção anticorpo do conjugado.

Tabela I.

	Tumor (-)		Tumor (+)
AB	2T	$55 \pm 18^*$	39 ± 21
	AUC	2.251 ± 406	997 ± 241
	CL	$0,0012 \pm 0,0002$	$0,0025 \pm 0,0007$
	Vss	5 ± 2	7 ± 4
CM	2T	$29 \pm 5,8$	$22,4 \pm 6,3$
	AUC	1.236 ± 233	681 ± 164
	CL	$0,002 \pm 0,000$	$0,004 \pm 0,001$
	Vss	$4,6 \pm 1,2$	$5,2 \pm 0,9$

AB = porção do anticorpo,

CM = caliqueamicina ligada ao anticorpo,

2T = meia-vida do plasma (h),

5 AUC = área sob a curva ($h \cdot \mu\text{g/ml}$),

CL = eliminação (ml/min/kg),

Vss = distribuição volumétrica (ml/kg).

REIVINDICAÇÕES

1. Método de determinação de uma quantidade de uma molécula alvo e uma quantidade de um conjugado molécula alvo/fármaco em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- 5 a) o fornecimento de um suporte sólido compreendendo uma superfície na qual um alvo é imobilizado;
- b) o fornecimento de uma amostra compreendendo diversos conjugados molécula alvo/fármaco;
- 10 c) o contato da mostra com o alvo imobilizado na superfície do suporte sólido;
- d) detecção da formação na superfície do suporte sólido em um primeiro complexo de ligação da (i) molécula alvo e (ii) o alvo na superfície do suporte sólido, em que a formação de um primeiro complexo de ligação causa uma primeira alteração mensurável na propriedade da massa do su-
- 15 porte sólido indicando uma quantidade da molécula alvo no mesmo;
- e) o contato do primeiro complexo de ligação com um agente de ligação do fármaco que se liga especificamente com o fármaco do conjugado molécula alvo/fármaco; e
- 20 f) detecção da formação na superfície do suporte sólido de um segundo complexo de ligação do (i) agente de ligação do fármaco e (ii) o primeiro complexo de ligação, em que a formação do segundo complexo de ligação causa uma segunda alteração no mensurável na propriedade da massa do suporte sólido indicando uma quantidade do conjugado molécula alvo/fármaco no mesmo.

25 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o alvo é expressado nas células de câncer ou em células envolvendo uma resposta autoimune.

30 3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o alvo expressado nas células de câncer é 5T4, CD19, CD20, CD22, CD33, Lewis Y, HER-2, receptor Fg do tipo I para a imunoglobulina G (Fc gama RI), CD52, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), fator do crescimento endotelial vascular (VEGF), complexo DNA/histona,

antígeno carcinoembrionário (CEA), CD47, VEGFR2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular ou receptor contendo o domínio de inserção da quinase, KDR), molécula de adesão da célula epitelial (Ep-CAM), proteína de reativação do fibroblasto (FAP), receptor de rastros I (DR4), receptor da progesterona, antígeno oncofetal CA19.9, ou fibrina.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a molécula alvo é um anticorpo.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o fármaco é a caliqueamicina.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação do fármaco é um anticorpo.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra compreende um volume de aproximadamente 5 µl ou menos.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra de sangue.

9. Método de determinação de uma quantidade de um conjugado molécula alvo/fármaco em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) fornecimento de um suporte sólido compreendendo uma superfície na qual um primeiro complexo de ligação é imobilizado, em que o complexo de ligação compreende (i) um alvo e (ii) um conjugado molécula alvo/fármaco ligado ao alvo;

b) contatar um agente de ligação do fármaco que liga especificamente o fármaco do conjugado molécula alvo/fármaco com o primeiro complexo de ligação imobilizado na superfície do suporte sólido; e

c) detecção da formação de um segundo complexo de ligação do (i) agente de ligação do fármaco e o (ii) primeiro complexo de ligação na superfície do suporte sólido, em que a formação do complexo causa uma alteração mensurável na propriedade da massa do suporte sólido indicando uma quantidade do conjugado molécula alvo/fármaco na amostra.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo

fato de que o alvo é expressado nas células de câncer ou em células envolvendo uma resposta autoimune.

11. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o alvo expressado nas células de câncer é 5T4, CD19, CD20, 5 CD22, CD33, Lewis Y, HER-2, receptor Fg do tipo I para a imunoglobulina G (Fc gama RI), CD52, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), fator do crescimento endotelial vascular (VEGF), complexo DNA/histona, antígeno carcinoembrionário (CEA), CD47, VEGFR2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular ou receptor contendo o domínio de inserção 10 da quinase, KDR), molécula de adesão da célula epitelial (Ep-CAM), proteína de reativação do fibroblasto (FAP), receptor de rastro I (DR4), receptor da progesterona, antígeno oncofetal CA19.9, ou fibrina.

12. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a molécula alvo é um anticorpo.

13. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo 15 fato de que o fármaco é a caliqueamicina.

14. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação do fármaco é um anticorpo.

15. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo 20 fato de que a amostra compreende um volume de aproximadamente 5 µl ou menos.

16. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra de sangue.

17. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo 25 fato de que a quantidade da molécula alvo na mostra é determinada pela medição de uma alteração na propriedade da massa de um suporte sólido quando da ligação dos conjugados molécula alvo/fármaco a um alvo imobilizado na superfície do suporte sólido.

18. Método de determinação de uma quantidade média do fármaco 30 carregado por molécula alvo em uma amostra de conjugados molécula alvo/fármaco, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) fornecimento de um suporte sólido no qual os conjugados mo-

lécula alvo/fármaco de uma amostra são ligados;

b) determinação de uma quantidade do fármaco em uma amostra pela medição de uma alteração na propriedade da massa de um suporte sólido, quando da ligação de um agente de ligação do fármaco que especificamente liga o fármaco do conjugado molécula alvo/fármaco com os conjugados molécula alvo/fármaco na superfície do suporte sólido e;

c) cálculo da quantidade média do fármaco em um conjugado molécula alvo/fármaco pela divisão da quantidade do fármaco no item (b) por uma quantidade da molécula alvo na mostra.

10 19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o alvo é expressado nas células de câncer ou em células envolvendo uma resposta autoimune.

20. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o alvo expressado nas células de câncer é 5T4, CD19, CD20, CD22, CD33, Lewis Y, HER-2, receptor Fg do tipo I para a imunoglobulina G (Fc gama RI), CD52, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), fator do crescimento endotelial vascular (VEGF), complexo DNA/histona, antígeno carcinoembriônico (CEA), CD47, VEGFR2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular ou receptor contendo o domínio de inserção da quinase, KDR), molécula de adesão da célula eritelial (Ep-CAM), proteína de reativação do fibroblasto (FAP), receptor de rastro I (DR4), receptor da progesterona, antígeno oncofetal CA19.9, ou fibrina.

21. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a molécula alvo é um anticorpo.

25 22. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o fármaco é a caliqueamicina.

23. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação do fármaco é um anticorpo.

30 24. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a amostra compreende um volume de aproximadamente 5 µl ou menos.

25. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pe-

lo fato de que a amostra é uma amostra de sangue.

26. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a quantidade da molécula alvo na mostra é determinada pela medição de uma alteração na propriedade da massa de um suporte sólido quando da ligação dos conjugados molécula alvo/fármaco a um alvo imobilizado na superfície do suporte sólido.

Fig.01

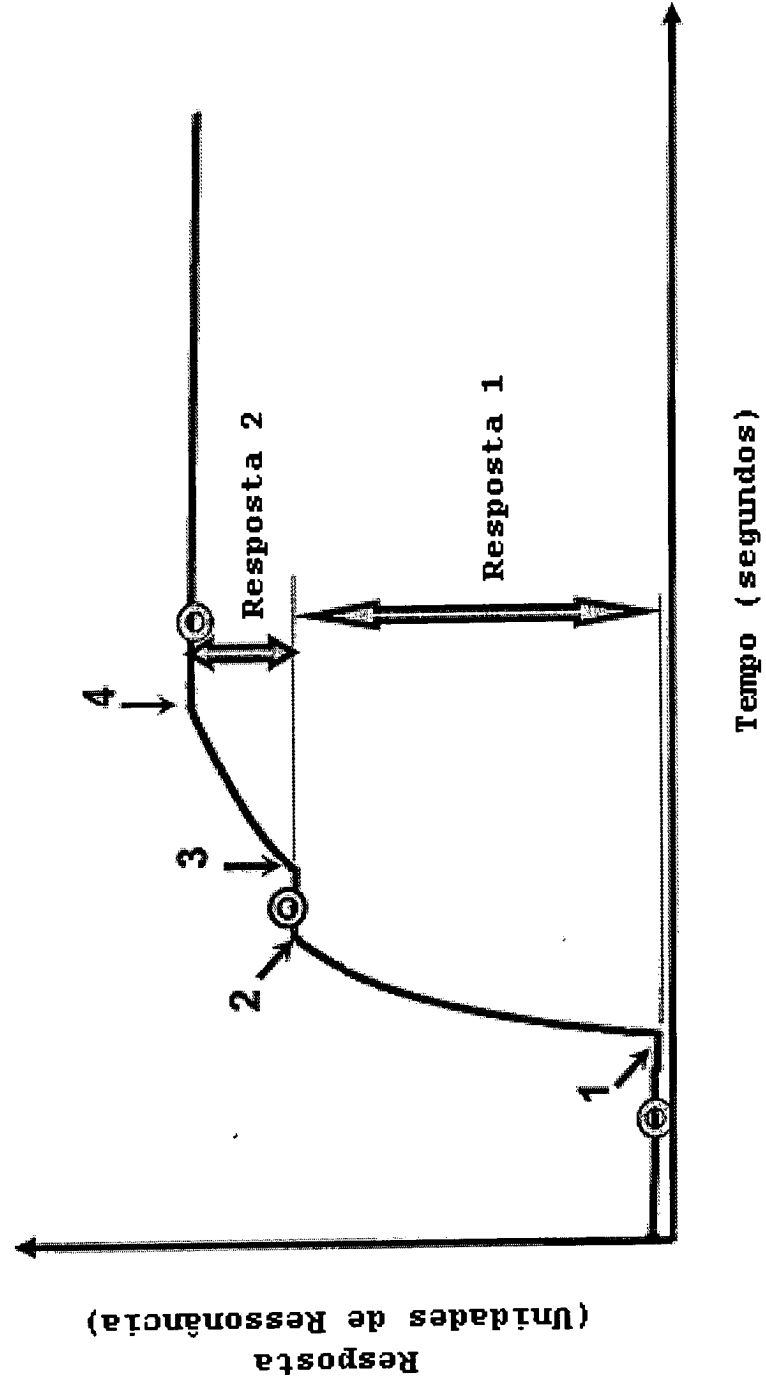
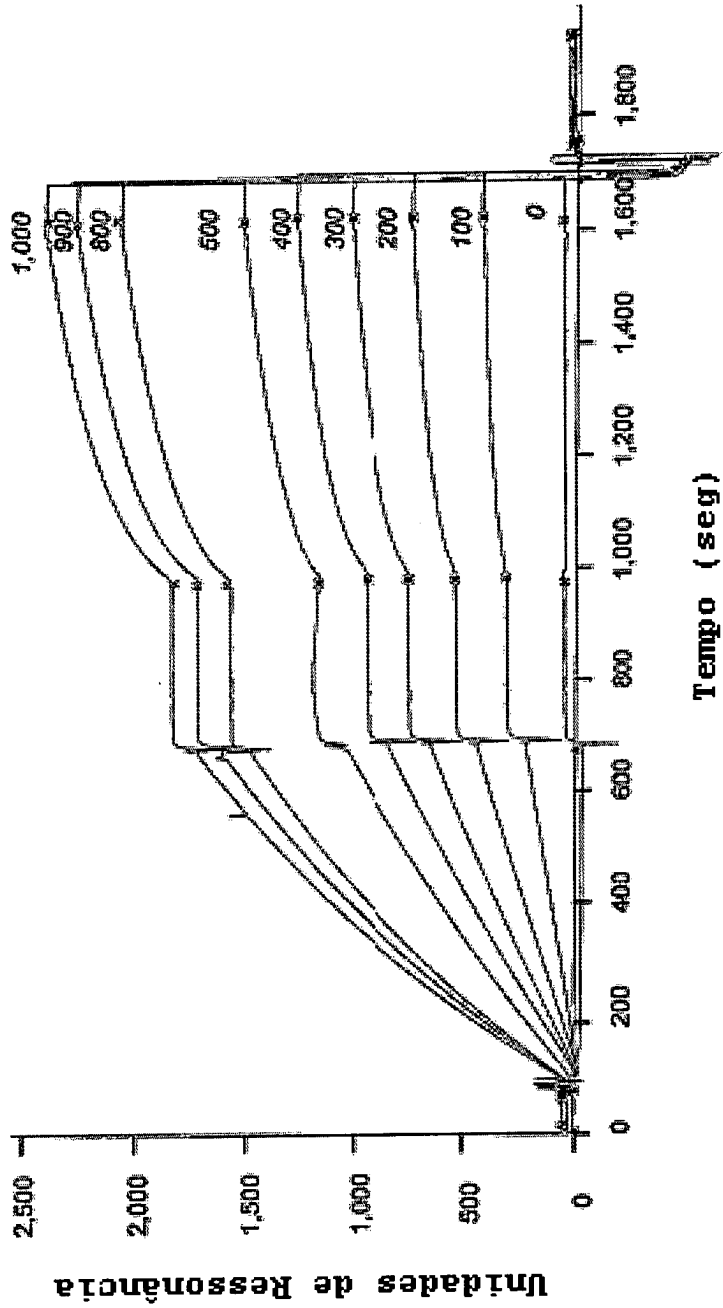


Fig. 2A



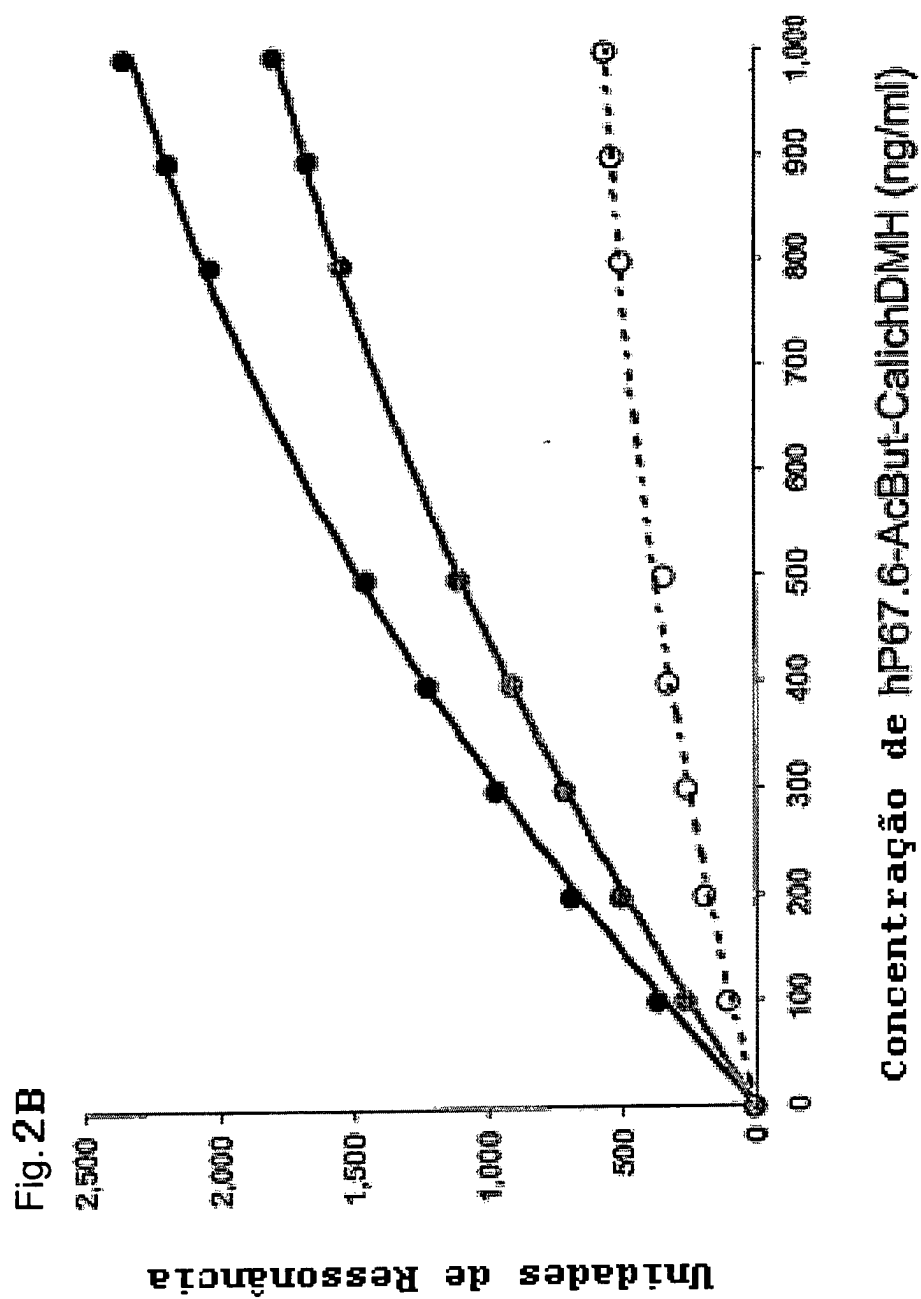
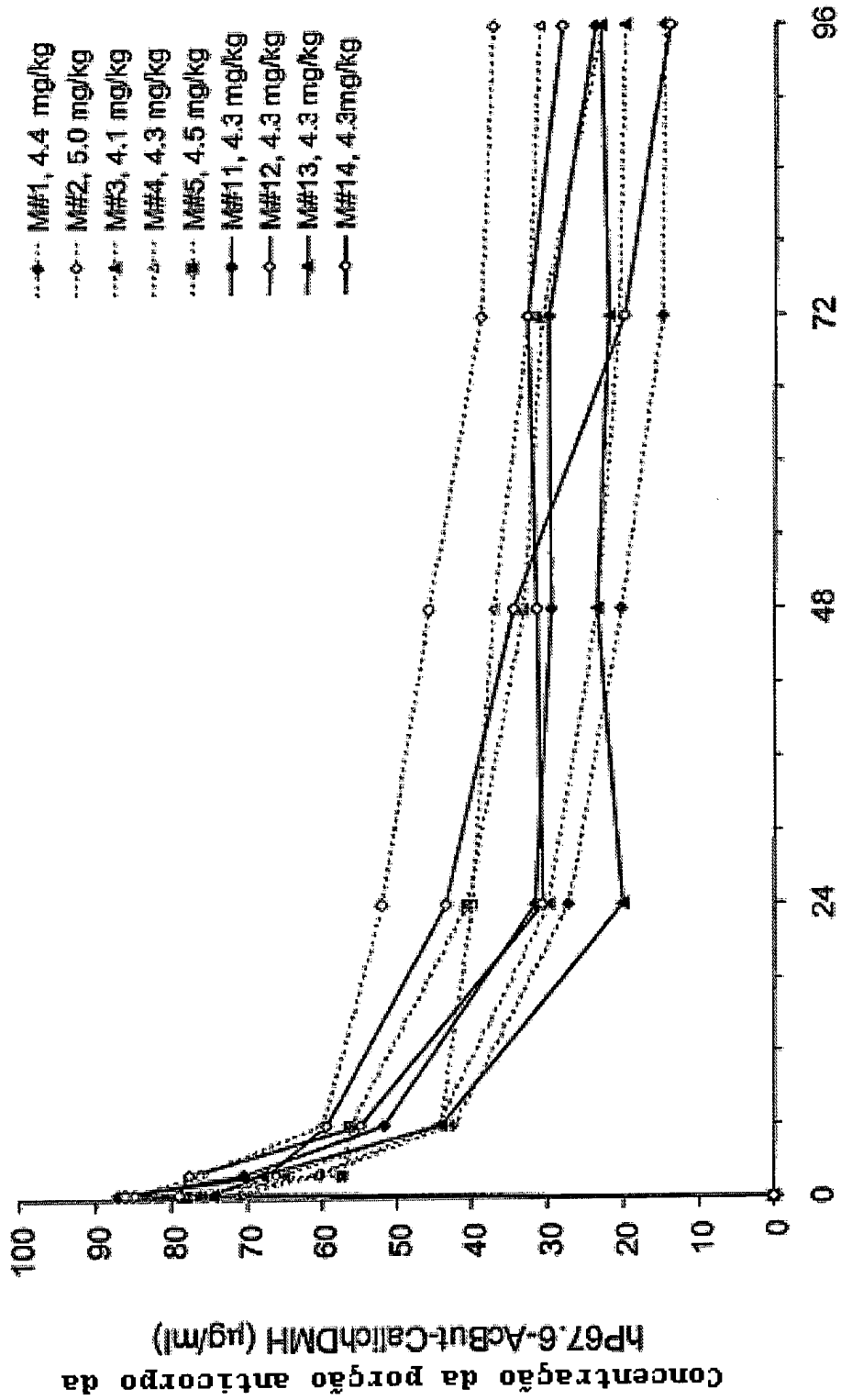
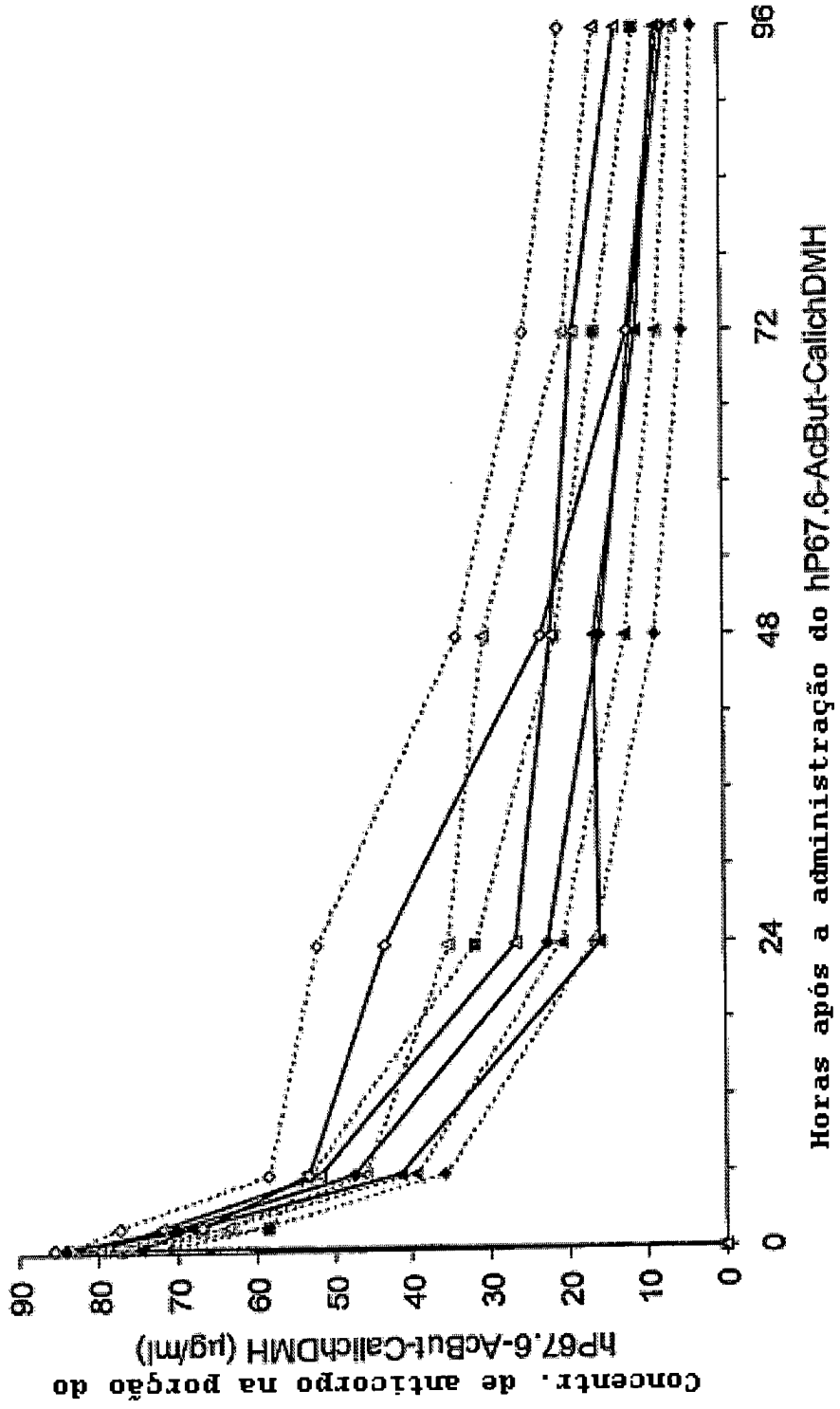


Fig. 3A



Horas após administração do hp67.6-AcBut-CalichDMH

Fig. 3B



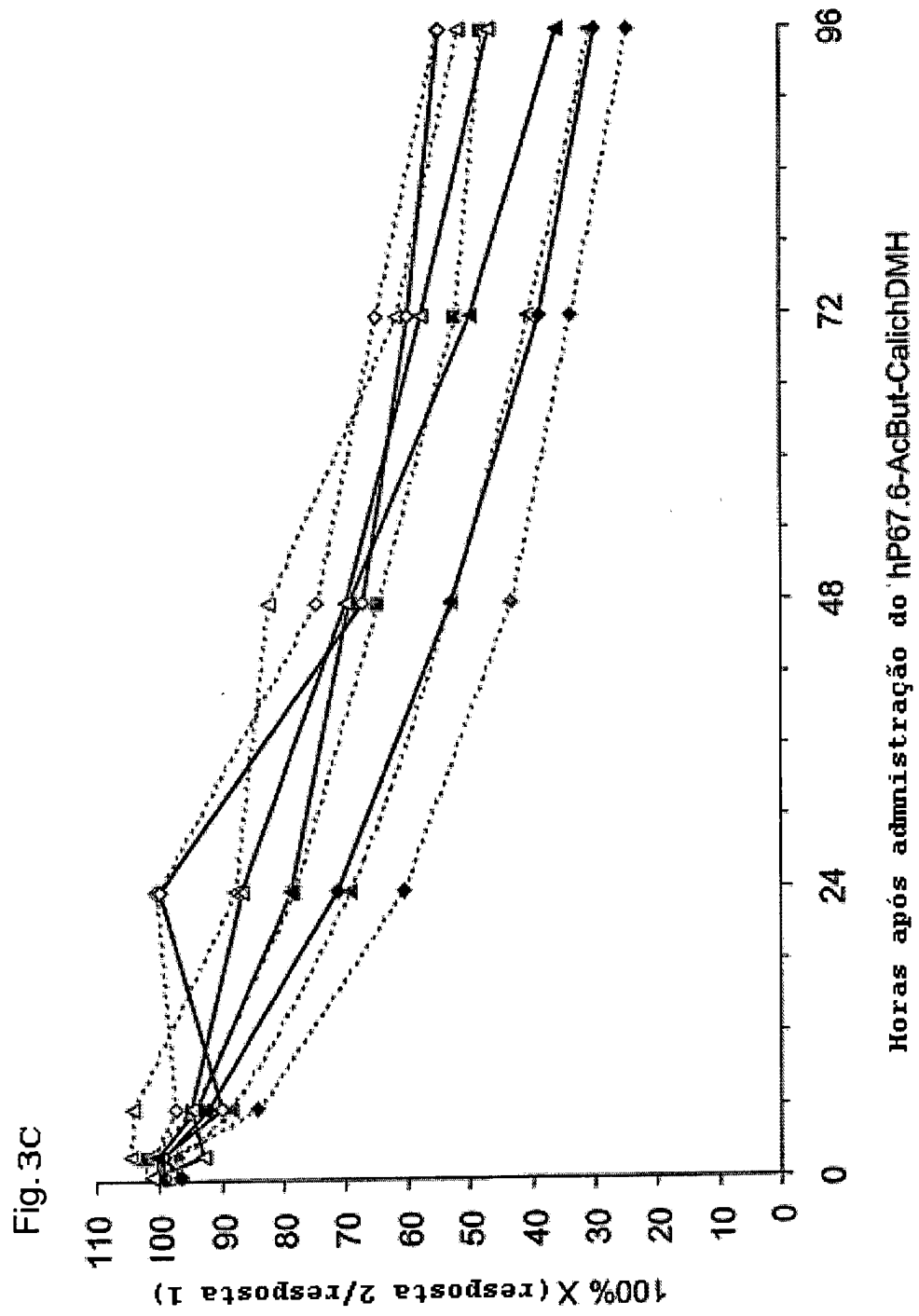


Fig. 4

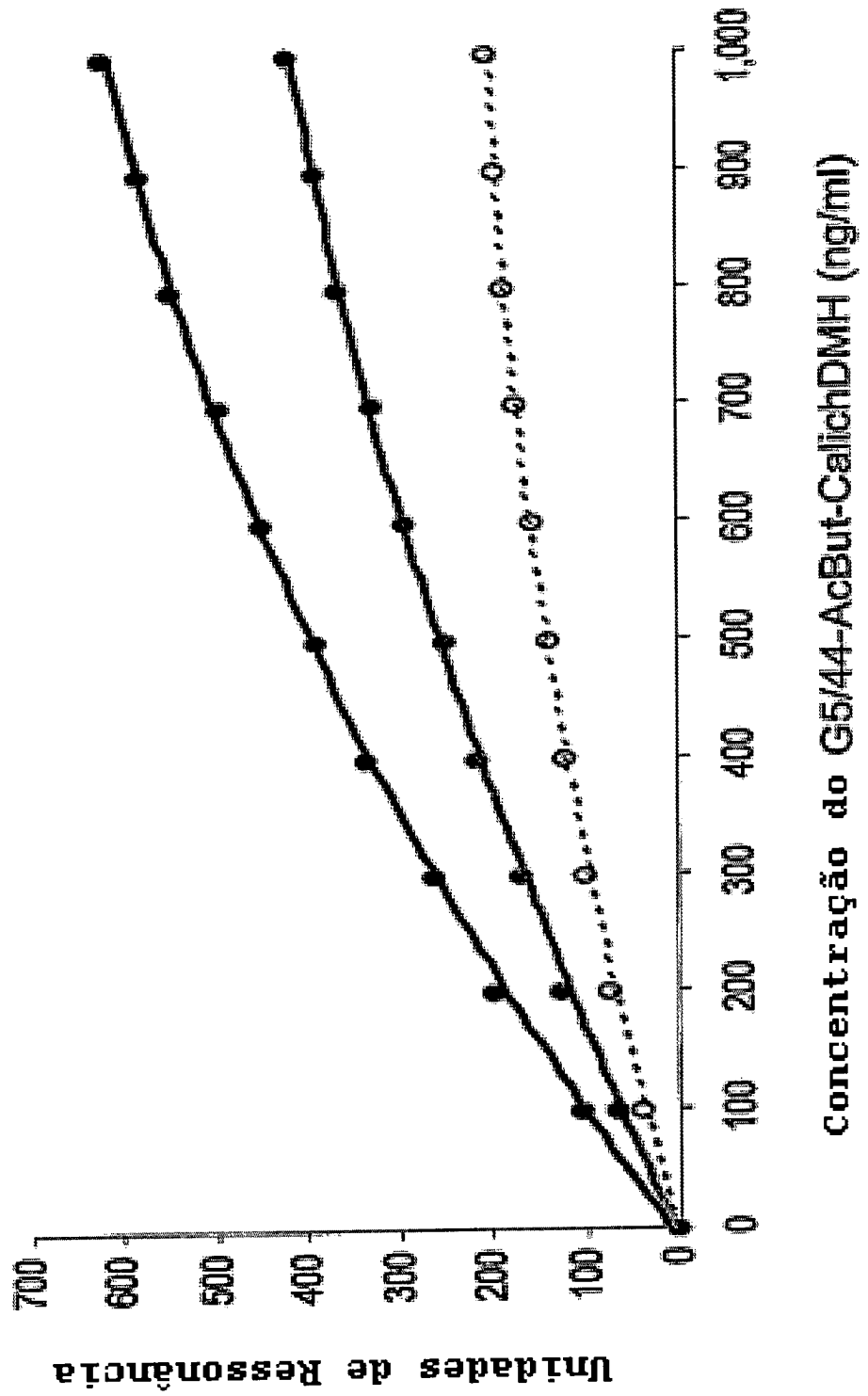


Fig. 5A

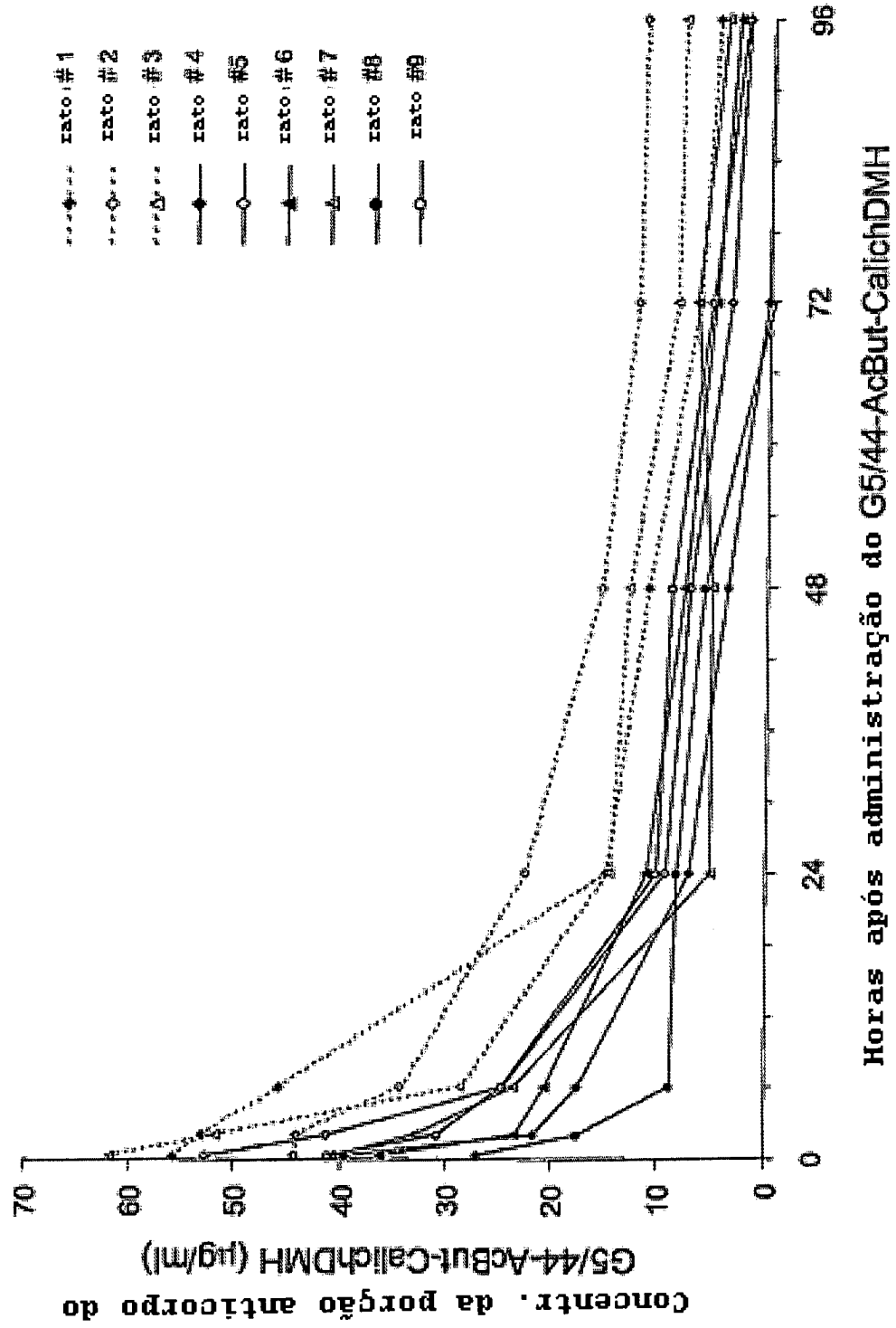


Fig.5B

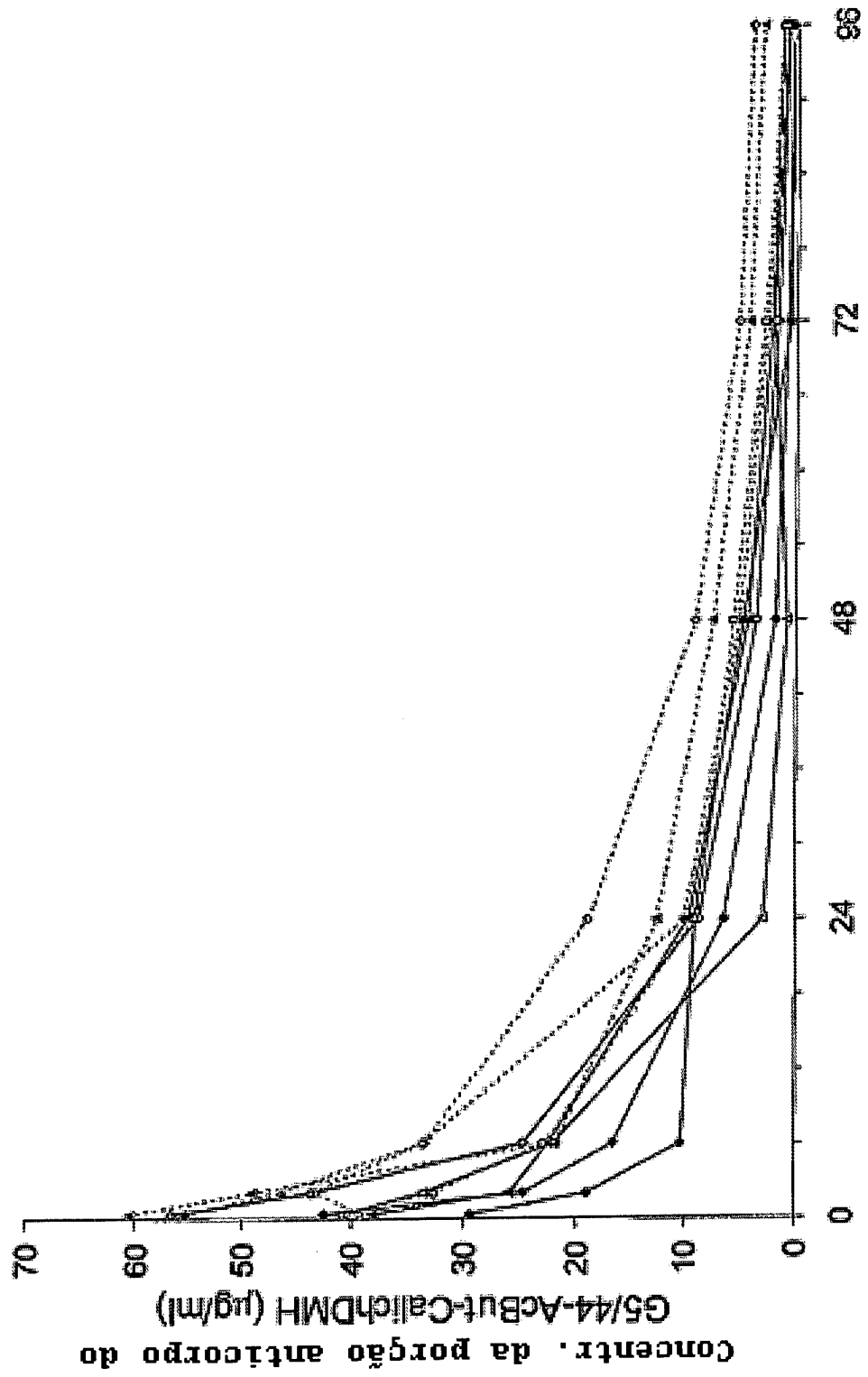
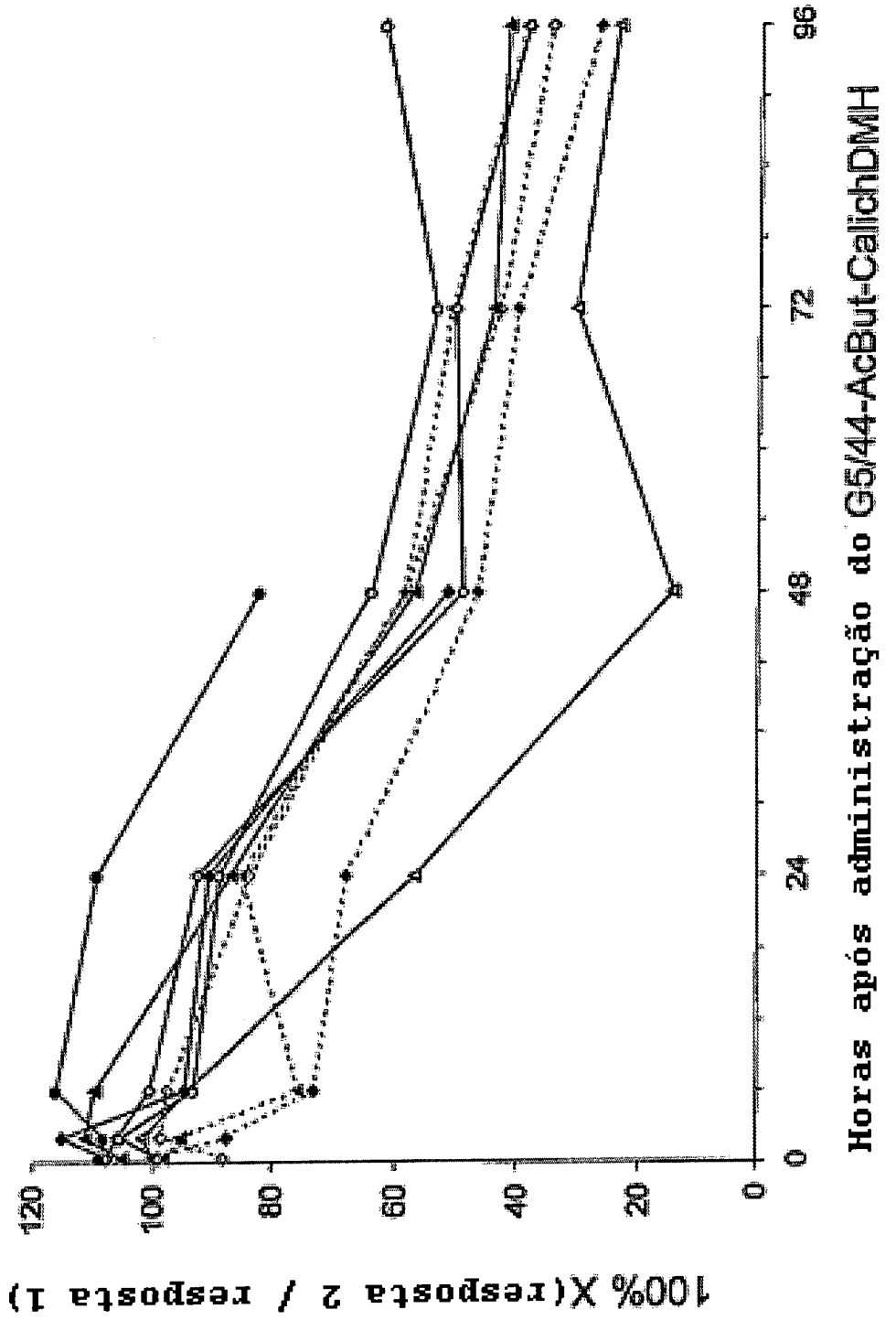


Fig. 5C



RESUMO

Patente de Invenção: "**MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DE TERAPIAS DE OBJETIVO**".

5 A presente invenção refere-se a métodos para a determinação da farmacocinética de terapias objetivadas utilizando técnicas de detecção de massa.