



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 811**

51 Int. Cl.:

A61K 51/10 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00980133 .3**

96 Fecha de presentación : **05.12.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1237584**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.09.2002**

54 Título: **Conjugados de unión con un receptor.**

30 Prioridad: **06.12.1999 NO 19995978**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.09.2011

73 Titular/es:
**ANTICANCER THERAPEUTIC INVENTIONS AS
P.O. Box 96, Blindern
0314 Oslo, NO**

72 Inventor/es: **Henriksen, Gjermund y
Larsen, Roy, H.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 364 811 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de unión con un receptor.

La presente invención se refiere a un conjugado de unión con un receptor, que consiste en un anticuerpo, un radionucleido y folato, en el que el conjugado posee o no una doble capacidad de unión. La presente invención también se refiere a un método para preparar tales conjugados, así como un método para usarlos. Además se describe el uso de un conjugado de acuerdo con la presente invención para preparar una solución farmacéutica.

El uso de folato y derivados de folato para marcar como diana tumores que expresan proteína de unión con folato (FBP), una proteína de la membrana de la célula unida a glicosil-fosfatidil-inositol implicada en la absorción celular de folatos oxidados por medio de endocitosis, ha llamado la atención entre los investigadores [Kranz et al, 1996; Reddy et al, 1998; Shinoda et al, 1998; Trippet et al, 1999]. Dado que se ha demostrado que varios tipos de células cancerosas humanas sobreexpresan FBP, este receptor puede ser una posible diana para el suministro de radioisótopos terapéuticos conjugados con folato. Se ha demostrado que podrían usarse varios tipos de conjugados de bajo peso molecular de folato-quelato-radionucleido, para marcar como diana células que expresan FBP tanto *in vitro* como *in vivo* [Mathias et al, 1998]. Sin embargo, la farmacocinética puede no favorecer a las moléculas pequeñas por cuanto generalmente tales moléculas son rápidamente eliminadas del cuerpo, y exponiendo así a los receptores de folato en los riñones a una concentración más alta de sustancias radiofarmacéuticas. Además, la absorción tumoral se limitaría, ya que la concentración en sangre en los tejidos diana disminuye rápidamente.

El documento EP-A-282057 describe ciertos conjugados de anticuerpos con radioisótopos y agentes quimioterapéuticos. En el documento US-4336185 se describen ciertos conjugados de proteína y derivados radioyodados de folato, y en Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 15 (6): 587-627 1998 se revisa el uso del folato en el señalamiento como diana.

En un estudio anterior, Shinoda et al. (1998) evaluaron albúmina de suero bovino (BSA) conjugada con folato marcada con el radionucleido indio-111, y encontraron que había una diferencia significativa en la farmacocinética y la biodistribución de BSA no marcada con folato en comparación con la BSA marcada con folato. Una elevada absorción en el hígado y rápido aclaramiento o *clearance* en la sangre indicaron que la versión de ¹¹¹In-BSA marcada con folato no era particularmente adecuada para el suministro de radionucleido a células tumorales que expresan proteína de unión con folato.

En el alcance del conocimiento de los presentes inventores, la combinación de folato-anticuerpo-radionucleido no ha sido presentada anteriormente, si bien la combinación de folato y anticuerpo si que ha sido evaluada para otros usos. Kranz, et al. (1996) conjugaron folato con un anticuerpo anti célula efectora con el intento de (1) unir el folato-anticuerpo a proteína de unión con folato en las células diana y (2) realizar la lisis de las células señaladas como diana debido a la porción de unión con el antígeno del anticuerpo interaccionado con una célula efectora. Sin embargo, el sistema receptor FBP no ha sido aún usado con éxito para dirigir radionucleidos a células cancerosas.

Para dirigir radionucleidos a los tumores que contienen FBP en escenarios locorregionales en particular, puede ser ventajoso usar vehículos más grandes que no se difundan con demasiada rapidez desde la zona en la que son inyectados. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra la FBP (Campbell et al., 1991), pero el problema con los anticuerpos monoclonales es que normalmente contienen proteína completa o secuencias de péptidos procedentes de especies no humanas, y por consiguiente son inmunógenos en diversos grados cuando se usan en personas. Esto puede impedir el uso de anticuerpos monoclonales en protocolos que requieren inyecciones repetidas a causa de la aparición de anticuerpos anti-ratón humanos o anticuerpos anti-quiméricos humanos, que causan la inmunocomplejación y la biodistribución desfavorable de los radioinmunoconjugados (Bruland et al., 1995; Meredith et al., 1993). También, los anticuerpos monoclonales y sus fragmentos suelen ser tan solo monovalentes o bivalentes (es decir, no multivalentes) con respecto a los sitios de combinación con el antígeno.

Por tanto el objeto de la presente invención es proporcionar un agente efectivo de señalamiento como diana del tumor selectivo para el receptor (conjugado) preparado a partir de una molécula portadora (es decir, un anticuerpo), un radionucleido y folato que está unido químicamente al portador. El conjugado debe también al mismo tiempo retener una capacidad significativa de combinar antígeno para el antígeno original; es decir, el conjugado posee doble capacidad de unión. Además, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para preparar y usar tales conjugados. Estos objetos han sido obtenidos por la presente invención, caracterizada por las reivindicaciones anexas.

La presente invención se refiere a una nueva clase de derivados de folato (conjugados), así como a un método para preparar y usar tales conjugados. El conjugado consiste en (1) un anticuerpo o anticuerpos preferentemente de la clase de IgG o IgM, o fragmentos o construcciones de las mismas (p. ej. un minicuerpo), (2) un radionucleido y (3) folato. De acuerdo con la presente invención, el conjugado contiene solamente proteínas/péptidos humanos y puede tener una mayor avidez, debido a la posibilidad de conjugar múltiples folatos por anticuerpo, y de esta forma aumentar la probabilidad de unir el conjugado a las células diana. El anticuerpo que se usa es un anticuerpo inerte o bien un anticuerpo monoclonal con afinidad hacia un antígeno asociado a un tumor. En el primer caso, se construye un conjugado con afinidad para FBP solo, mientras que en el segundo caso se hace un conjugado con afinidad por el receptor potencialmente doble, ya que el antígeno retiene una significativa capacidad de combinar antígeno para el antígeno original, así

como capacidad de unión para el folato a FBP. La principal ventaja de la doble afinidad por el receptor es que se reducirá la abundancia de células diana sin al menos un receptor para el conjugado, aumentando las oportunidades de un señalamiento como diana con éxito. A juicio de los presentes inventores, ellos son los primeros en proponer el uso de folato-anticuerpo-radionucleido para suministrar radiación a células tumorales.

5 La presente invención se describirá ahora con más detalle, con referencia a las figuras y los ejemplos.

Figura 1. Ensayo de unión para folato marcado con tritio (^3H -FA; gráfica de arriba) y para IgG humana policlonal marcada con folato y yodo-125 IgG (^{125}I -FA-HIgG; gráfica de abajo).

Figura 2. Unión de folato-TP IgG- ^{125}I a células HELA-S3; intervalo de 10 - 50 ng/ml.

Figura 3. Ensayo de unión de Folato-HIgG- ^{125}I en células HELA-S3, intervalo de 1 - 10 ng/ml.

10 Figura 4. Unión de folato-TP-3 IgG- ^{125}I a células OVCAR-3; intervalo de 0,1 - 20 ng/ml.

Figura 5. Unión específica de conjugado a las células.

Figura 6. Ensayos de unión de anticuerpo monoclonal TP-3 IgG marcado con folato frente a no marcado con folato en células OHS.

15 Con el fin de desarrollar una nueva clase de derivados de folato, es decir, de crear un nuevo compuesto (conjugado) que podría, si se prefiere, contener solamente proteína/péptidos humanos, que es multivalente para FBP y que posee o no posee doble capacidad de unión, se dilucidó la posibilidad de usar anticuerpos marcados con folato y radioisótopo. Las ventajas de usar anticuerpos en tales conjugados son dobles: El mayor tamaño del anticuerpo, en comparación con los compuestos de bajo peso molecular, afecta a la farmacocinética de los conjugados, es decir, si se inyectan por vía intravenosa producen un aclaramiento de la sangre más lento y el mantenimiento de la concentración de sustancia radiofarmacéutica, y por tanto una absorción por el tumor potencialmente más alta; si se inyectan de forma intracavitaria hacen más lento el aclaramiento de radioisótopo de la región [Larsen et al. 1995]. Dependiendo del grado de conjugación de folato (es decir, de la avidéz, o número de unidades combinantes de receptor), este conjugado puede ser multivalente con respecto a los sitios de unión combinante de FBP. Además, conjugando folato con anticuerpos que tienen capacidad de unión de antígeno hacia un antígeno diferente de la FBP, se crea un conjugado que puede unirse a dos receptores diferentes (es decir, que tiene doble capacidad de unión). Por ejemplo, si un anticuerpo que ha sido desarrollado contra un antígeno tal como, p. ej., el anticuerpo TP-3 anti-osteosarcoma, es marcado con folato y radioisótopo, puede unirse a células de osteosarcoma que expresan el antígeno por interacción convencional de anticuerpo y antígeno, pero también puede hacerlo a células que expresan FBP a través de los grupos folato. Este principio de doble capacidad de unión puede ser importante porque la expresión celular de FBP, así como el antígeno, puede variar en las células diana y subpoblaciones. Por consiguiente, si el propio anticuerpo también se une a las células tumorales a través de un receptor diferente, aumenta la probabilidad de conseguir un marcaje como diana terapéuticamente suficiente de todas las células tumorales. Así, este principio puede ser usado para señalar como diana dos poblaciones de células diferentes presentes con solamente uno de los receptores cada una, o podría usarse para aumentar la probabilidad de marcaje como diana de células que expresan ambos receptores. Este tipo de conjugado puede ser usado de muchas formas, incluyendo para dirigir radioisótopos terapéuticos o de diagnóstico a células cancerosas *in vivo*.

El principio de la doble capacidad de unión puede también ser usado para otras moléculas de unión con el receptor distintas del folato. P. ej., podrían conjugarse derivados de estrógeno y testosterona con anticuerpos con afinidad para el cáncer de mama o de próstata, proporcionando un conjugado con doble capacidad de unión para las células de cáncer de mama o de cáncer de próstata.

40 Adicionalmente, los autores de la presente invención han estudiado el uso de anticuerpos monoclonales contra un antígeno asociado al osteosarcoma con el fin de demostrar que, cuando son radiomarcados y marcados con folato, estos anticuerpos podrían poseer una doble afinidad por un receptor, es decir, afinidad tanto para la FBP como para el antígeno asociado a un osteosarcoma.

45 Cuando los autores de la presente invención evaluaron IgG humana marcada con folato radiomarcada con astatina-211 y yodo-125, encontraron sorprendentemente que la IgG radiomarcada marcada con folato frente a la no marcada con folato no mostró ninguna diferencia significativa en la biodistribución en ratones. En consecuencia, los autores llegaron a la conclusión de que el conjugado de folato-anticuerpo-radionucleido puede ser útil para señalar como diana un tumor *in vivo*.

50 El uso del conjugado de folato-anticuerpo-radioisótopo puede ser explotado tanto usando inyecciones intravenosas como para aplicaciones locorreregionales. P. ej., los conjugados basados en radionucleidos de vida corta (es decir, con un $t_{1/2}$ de unas pocas horas) pueden ser prometedores para el tratamiento del cáncer de ovario metastatizado intraperitonealmente, ya que este tipo de cáncer tiene una elevada probabilidad de sobreexpresar FBP, y dado que el aclaramiento de anticuerpos de la zona es relativamente lenta, asegurando una elevada concentración de sustancia radiofarmacéutica en el área afectada por el tumor.

- 5 La molécula de folato-anticuerpo-portador puede usarse para transportar diferentes isótopos, p. ej., alfa- y/o beta-emisores para terapia, y emisores de rayos X y/o gamma y/o emisores de positrones para escintilografía de tumores y tomografía de emisión de positrones (PET: positron-emission-tomography), respectivamente. Un halógeno, como se describe en la sección experimental, así como radionucleidos metálicos, pueden ser conjugados con el folato-anticuerpo, los radionucleidos metálicos por medio de quelantes bifuncionales con reactividad de acoplamiento, p. ej., hacia los grupos amino (p. ej. lisina) de las proteínas. Ejemplos de alfa emisores son ^{211}At , ^{212}Pb (como nucleido generador enlazado químicamente), ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{222}Ra , ^{224}Ra , ^{225}Ac y ^{227}Th . Ejemplos de beta emisores son ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{131}I , ^{153}Sm , ^{166}Ho y ^{186}Re . Ejemplos de emisor de rayos X y nucleido PET son $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{18}F . Una especial aplicación sería en la cirugía radioguiada, p. ej. con conjugado anticuerpo-folato marcado con ^{125}I .
- 10 En general, el folato puede ser acoplado a grupos amino en ligandos generando un éster activado en la posición α - o γ -carbonilo del folato. Existen varias formas de generar reactivos de acoplamiento activado a partir de folato (Readdy et al., 1998). El folato conjugado en la posición α puede no mostrar la misma actividad de receptor que el que está conjugado en posición γ . Es bien sabido que el folato puede ser acoplado a anticuerpos usando el método EDC (Readdy et al., 1998). Este método no es selectivo para la posición α - o γ -carbonilo del folato, pero la posición γ está favorecida estéricamente cuando se usa el método EDC. La conjugación de varios folatos por molécula de portador aseguraría que se incorpora al menos un folato γ -conjugado (Reddy et al., 1998).
- 15 Los métodos para generar conjugados de folato-anticuerpo-radionucleido usados en la presente invención indicaron que tanto el acoplamiento amina de reactivo de acoplamiento radioactivo como el marcaje con yodógeno de tirosina podrían usarse para generar un producto con propiedades para el señalamiento como diana de folato. Probablemente los métodos más generales para el radiomarcaje de anticuerpos son compatibles con el marcaje con folato. Cuando se usan reactivos de acoplamiento amino el rendimiento del radiomarcaje puede reducirse si el anticuerpo está muy premarcado con folatos debido a una reducción en las aminas de lisina disponibles. El radiomarcaje puede realizarse principalmente antes o después del marcaje con folato del anticuerpo.
- 20 El conjugado de folato-anticuerpo-radionucleido de acuerdo con la invención se usa para preparar una solución farmacéutica adecuada para inyección o infusión en mamíferos, incluyendo seres humanos. Esta solución es administrada al paciente necesitado de la misma a través de todas la vías de administración sistémica conocidas en la técnica. Son ejemplos las vías intravenosa, regional y/o intratumoral. En consecuencia, el preparado de acuerdo con la invención está compuesto del conjugado activo, opcionalmente de coadyuvantes, agentes de modificación aceptables farmacéuticamente, disolventes y vehículos, y comprende fluidos para inyección y/o fluidos para infusión adecuados para la vía de administración elegida.
- 25 El radioinmunoconjugado de acuerdo con la invención se usa además en combinación con otros radioinmunoconjugados, IgG e IgM marcadas con folato y radiomarcadas o fragmentos de las mismas, y/o otras formas de terapia radiofarmacéutica, quimioterapia, terapia de haz externo o cirugía para tratar células malignas que expresan proteína de unión con folato.
- 30 El conjugado de folato-anticuerpo-radionucleido se usa también en un método para formar imágenes de los tejidos o células que contienen receptor, que expresan la proteína de unión con folato, o que suministran radiación potencialmente terapéutica a células malignas que expresan la proteína de unión con folato, en donde el tejido maligno se elige entre el grupo que comprende p. ej. cáncer de cerebro, pulmón, cuello uterino, ovario y mama.
- 35 Un *kit* para la preparación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado con folato comprende un frasco que contiene una solución de ácido fólico, un frasco que contiene un agente de activación del acoplamiento (p. ej. 1-etil-3-(3-dietilaminopropil)carbodiimida) en solución, y opcionalmente un tercer frasco que contiene una solución con el radioisótopo o un ligando, bien sea premarcado o que puede ser subsiguientemente marcado con el radioisótopo por medio de unión covalente o quelación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 40 La presente invención también proporciona un preparado de una solución farmacéutica adecuada para radioterapia o radiodetección basada en el principio de doble capacidad de unión en la que el componente activo es un conjugado que consiste en (1) IgM, IgG o fragmentos y construcciones de las mismas que están marcadas con (2) un radionucleido y (3) en general una molécula (p. ej., estrógeno o un derivado, o testosterona o un derivado) con una afinidad por el receptor distinta de la del propio anticuerpo.
- 45 **Modo mejor.**
- 50 El conjugado de unión con el receptor de acuerdo con la invención consiste en tres componentes; (1) un anticuerpo o anticuerpos humanos preferentemente de la clase de IgG o IgM, o fragmentos o construcciones de los mismos (p. ej. minicuerpo), (2) un radionucleido o una mezcla de radionucleidos y (3) folato, en donde el conjugado posee o no una doble capacidad de unión con la diana, en donde el radionucleido puede ser elegido entre ^{211}At o ^{125}I .
- 55 El método para preparar un conjugado de unión con un receptor que consiste en tres componentes: (1) un anticuerpo o anticuerpos preferentemente de la clase de IgG o IgM, o fragmentos o construcciones de los mismos (p. ej. minicuerpo), (2) un radionucleido o una mezcla de radionucleidos y (3) folato, comprende usar procedimientos estándar para el marcaje con radionucleido y marcaje con folato del anticuerpo.

Generalmente las condiciones de preparación han de ser optimizadas para cada anticuerpo marcado a causa de las diferencias en el número de unidades de lisina y en la localización de las mismas (p. ej. sitios de combinación de anticuerpo la región no de unión).

Pretratamiento de la IgG.

5 La tanda de anticuerpo es sometida a intercambio en tampón usando una columna Sephadex PD-10 (Pharmacia) pre-equilibrada con el tampón usado para dar las condiciones óptimas de marcaje con folato para ese anticuerpo en particular, (p. ej. borato 0,05 M a pH 8,5). El anticuerpo se eluye a través de la columna y, si se precisa, se diluye con tampón para obtener una concentración adecuada para realizar las etapas de marcaje (p. ej. 1 - 50 mg/ml).

10 El procedimiento que se describe con detalle en los ejemplos que acompañan, pensados para que sean clarificadores pero no limitantes, consiste en las etapas siguientes:

Marcaje con folato.

15 El procedimiento general se describe en la sección experimental. En primer lugar, el folato es conjugado con el anticuerpo (típicamente 1 - 20 de folato por anticuerpo). Se añade al anticuerpo folato activado para acoplamiento en solución y se deja que la reacción prosiga durante un tiempo entre menos de 10 s y más de 2 días. La reacción puede ser apagada p. ej. añadiendo exceso de glicina en tampón de borato. El conjugado resultante se purifica usando separación por filtración en gel (exclusión de tamaños, p. ej. en columna Sephadex G-25 PD-10). En segundo lugar, el anticuerpo marcado con folato es radiomarcado con un radionucleido. El producto final se purifica mediante filtración en gel usando, p. ej., una columna Sephadex G-25 PD-10.

20 El radiomarcaje puede realizarse subsiguientemente a la conjugación con folato. Pueden usarse procedimientos estándar de radiomarcaje, como se describe con detalle en la sección experimental. Pueden prepararse conjugados radiomarcados con una actividad específica que se encuentra en el intervalo entre menos de 1 Bq/mg y varios GBq/mg de anticuerpo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Conjugación de folato con IgG humana.

25 *Pre-tratamiento de la IgG.*

Se usó IgG humana (HIgG) disponible comercialmente (Gammanorm; Pharmacia & Upjohn) a una concentración inicial de 165 mg/ml en tampón de glicina, NaCl y NaAc.

La H-IgG fue separada de los componentes de bajo peso molecular eluyendo la mezcla en una columna Sephadex G-25, (PD-10, Pharmacia) preequilibrada con PBS.

30 La concentración de IgG se determinó por lecturas de la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción para la proteína de 224 000.

El perfil de elución de la HIgG purificada en HPLC de exclusión de tamaños usando una columna TSK-G3000 SW_{xl} (Toso Haas) mostró esencialmente un pico correspondiente a la IgG.

(Sistema de HPLC; Shimadzu, bomba LC-10AT, detector de array de diodos SPD-M10A).

35 *Conjugación de ácido fólico.*

Para asegurar la reactividad, se preparó una solución madre de ácido fólico disolviendo ácido fólico disponible comercialmente (Sigma) en dimetil sulfóxido con un contenido de H₂O menor que 0,05%. La solución fue después canulada en un frasco que contiene tamices de 4 Å activados (Fluka) y almacenada bajo una atmósfera de argón en la oscuridad durante 6 a 10 horas.

40 Se incluyó ácido ¹H-fólico (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) como trazador en la preparación de ácido fólico y se añadió en forma de solución acuosa de la sal potásica del ácido ³H-fólico (1% con respecto al ácido cítrico) y a continuación se desecó a 8 mTorr durante 3 días. El ácido fólico que contiene ácido ³H-fólico fue después tratado como se describió anteriormente. El ácido fólico fue activado para acoplamiento a la HIgG, añadiendo 4 a 10 equivalentes molares de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida a la solución de ácido fólico e incubando durante 30 min a temperatura ambiente. Después de ello, se añadió a la H-IgG un exceso molar de 20 a 60 veces de ácido fólico 45 activado (15 mg/ml) en PBS y se dejó reaccionar durante 30 a 60 min. La reacción fue apagada añadiendo 0,2 ml de glicina 0,3 M en PBS/borato, pH 8,5. El conjugado de ácido fólico y HIgG (FA-HIgG) fue separado del material no reaccionado usando una columna PD-10 preequilibrada en PBS. Las fracciones individuales se ensayaron en relación con la presencia de agregados/dímeros/ fragmentos de HIgG o componentes de bajo peso molecular mediante HPLC de exclusión de tamaños.

50

El alcance de la conjugación de ácido fólico se determinó mediante el contenido de ^3H de la FA-HlgG purificada, medido mediante el conteo de centelleo de líquido (Beckmann LS 6500) combinado con la determinación de la concentración de proteína espectrofotométricamente; la concentración de proteína se determinó mediante la absorción a 280 nm corrigiendo la contribución a la absorción que es debida al ácido fólico a esta longitud de onda, calculada a partir del coeficiente de extinción, y la concentración de ácido fólico se obtuvo a partir de las medidas de ^3H .

Ejemplo 2: Preparación de ^{125}I -FA-HlgG y ^{211}At -FA-HlgG.

Radiyodación por el método del yodógeno.

La FA-HlgG en PBS (típicamente 2 a 5 mg/ml) fue yodada por el método del yodógeno usando una metodología estándar (Fraker et al., 1978). El producto radiomarcado fue purificado mediante PD-10 y se ensayó en una columna de HPLC de exclusión de tamaños. Este estudio indicó que el rendimiento de producto radiomarcado era similar si el anticuerpo era marcado con folato antes o después del radiomarcaje.

Radiomarcaje usando el N-succinimidil-3-[^{125}I]yodobenzoato (método ATE).

Se añadió anticuerpo marcado con folato o anticuerpo solo, típicamente a concentraciones de 1 a 10 mg/ml en tampón de borato (pH 8-9), a un frasco seco que contiene N-succinimidil-4-[^{211}At]astatobenzoato o bien N-succinimidil-3-[^{125}I]yodobenzoato. Los dos reactivos de marcaje habían sido preparados como se ha descrito (Larsen et al., 1994b). Al cabo de 15 min de suave agitación del frasco, se añadieron 0,3 ml de glicina 0,2 M en borato (pH 8-9) y el frasco se agitó durante 5 min más. Después de esto la solución fue transferida a una columna Sephadex G-25 PD10 (Pharmacia) y la IgG radiomarcada se eluyó usando un tampón de PBS (pH 7,4).

Resultados: Los valores del rendimiento de marcaje global estaban en el intervalo de 35 a 60% usando este método. Estos procedimientos fueron usados para TP-3, Rituximab e IgG policlonal humana, así como TP-1 F(ab')₂ y podrían ser llevados a cabo de una forma similar con N-succinimidil-[^{211}At]astatobenzoato (Larsen et al., 1994).

En un experimento para determinar la fracción unida a proteína de ^{211}At y ^{125}I , el producto purificado fue evaluado usando precipitación de la proteína con metanol. Precipitó más del 97% de la radioactividad para los preparados ^{125}I -FA-HlgG, ^{211}At -FA-HlgG, ^{125}I -HlgG y ^{211}At -HlgG.

Ejemplo 3: Biodistribución de ^{125}I -FA-HlgG y ^{211}At -FA-HlgG frente a ^{125}I -HlgG y ^{211}At -HlgG.

Métodos: Un preparado único de FA-HlgG con una relación media FA/HlgG de 2,3 fue usado para la preparación tanto de ^{125}I -FA-HlgG como de ^{211}At -FA-HlgG y para comparación también fueron preparados ^{125}I -HlgG y ^{211}At -HlgG como se describe en el ejemplo 2.

Se usaron ratones blancos Balb/C hembra con un peso corporal en el intervalo de 16 a 20 g en el experimento de biodistribución. Los compuestos fueron administrados por inyección intraperitoneal de 500 μl del preparado a cada animal. Los compuestos fueron administrados en disposición de marcadores emparejados (^{211}At -FA-HlgG frente a ^{125}I -HlgG y ^{125}I -FA-HlgG frente a ^{211}At -HlgG) usando aproximadamente 100 kBq de ^{211}At y 50 kBq de ^{125}I para cada animal. Los animales fueron sacrificados por luxación cervical y la distribución en el tejido se determinó a los tiempos 1, 6 y 24 horas, usando grupos de 3 ratones para cada tiempo y realizando los experimentos en dos series, invirtiendo el marcador frente al tipo de anticuerpo (con respecto al folato). El contenido de radioactividad de las muestras de tejido se midió en un detector de NaI (T1) de tipo pocillo. En primer lugar, la ventana y el umbral del detector fueron ajustados con el fin de medir desintegraciones de ^{211}At sin cruce detectable procedente del ^{125}I . En segundo lugar, después de un periodo de tiempo correspondiente a 20 veces el valor de la vida mitad del ^{211}At , las muestras de tejido fueron medidas de nuevo para la cuantificación del contenido de ^{125}I . Muestras de preparados de HlgG radiomarcados con un único nucleido y mezclas de los nucleidos fueron usadas como referencias.

Resultados: La Tabla 1 muestra la relación de distribución entre las HlgG radiomarcadas marcadas con folato y no marcadas con folato. Las relaciones se mantuvieron entre 0,7 y 1,9 en todos los puntos, lo que indica cambios de distribución solamente minoritarios como efecto del marcador de folato en el anticuerpo. No se determinó ningún efecto significativo del marcador de folato para los riñones, que se consideran un tejido sensible a causa de los receptores de unión con folato. En general, el marcaje con folato no tuvo un mayor impacto de la biodistribución de anticuerpo radiomarcado, lo que indica que los radioinmunoconjugados marcados con folato pueden ser útiles para aplicaciones *in vivo*.

Conclusión: El aclaramiento renal de la IgG marcada con folato parecía ser lenta evitando la acumulación en los receptores de unión de folato en los riñones. El marcaje con folato tampoco tenía un mayor impacto sobre la biodistribución de HlgG radiomarcada en otros tejidos, indicando que las IgG marcadas con folato y radiomarcadas podrían ser herramientas útiles para el tratamiento del cáncer.

TABLA 1

Relación de distribución¹ de IgG humana radiomarcada marcada con folato frente a la no marcada con folato realizada en la forma de "marcador emparejado" usando astatina-211 y yodo-125.

Tejido	1 h	6 h	24 h
Sangre	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,5	0,7 ± 0,3
Riñón	1,2 ± 0,7	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2
Hígado	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,6	0,8 ± 0,3
Grasa I. P.	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,3
Cuello	1,9 ± 1,2	1,0 ± 0,6	1,5 ± 0,8
Pulmón	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Músculo	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Corazón	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,3
Intestino delgado	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,1
Intestino grueso	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,1
Bazo	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,2
Estómago	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,9	1,4 ± 1,3
Fémur	1,7 ± 0,6	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1

5 ¹ Los experimentos fueron realizados en dos series, 3 animales por cada valor del tiempo en una serie. La combinación de radiomarcador y tipo de anticuerpo (marcado con folato frente a no marcado con folato) fue invertida entre las dos series.

Ejemplo 4: Ensayo de unión de ácido fólico y conjugados de ácido fólico.

10 Se usó proteína de unión con folato (FBP) inmovilizada para investigar las características de unión de los conjugados de ácido fólico. Una FBP (Sigma) con una capacidad de unión de 2,5 g de ácido fólico por miligramo de proteína Se inmovilizó en placas de ensayo EIA/RIA de 96 pocillos de alta capacidad de unión de proteína (Costar Corning Inc. N.Y., EE.UU.).

Investigación de la inmovilización de la proteína de unión con folato.

15 La FBP fue marcada con ¹²⁵I por el método del yodógeno y la proteína marcada fue aislada eluyendo la mezcla de reacción en una columna PD-10. Se añadió ¹²⁵I-FBP purificada, en concentraciones que se encuentran en el intervalo de 5 a 20 g/ml en PBS, a las placas de ensayo de 96 pocillos, y se incubaron en una gradilla giratoria a 4° C durante la noche. El líquido de los pocillos fue eliminado (L1) y los pocillos fueron lavados a continuación cuatro veces con PBS (L2) (temperatura ambiente). Después de esto, se añadió a los pocillos NaOH 2M y se dejaron reposar aproximadamente 1 h a temperatura ambiente antes de eliminar el líquido (L3). Las cantidades inmovilizadas de las diversas concentraciones de cuadruplicados de ¹²⁵I FBP fue determinada como la relación de L3/L1+L2 después de medir la radioactividad de las muestras respectivas mediante conteo de centelleo de líquidos. Las condiciones que dieron por resultado un promedio de 1 g de FBP inmovilizada en los pocillos fueron usadas en los ensayos de unión de ³H-FA y ¹²⁵I-FA-HIgG.

Unión de ³H-FA a proteína de unión con folato inmovilizada.

25 Los pocillos fueron incubados con una solución de FBP en PBS y se lavaron tres veces con PBS después de eliminar la mezcla de incubación. Se añadió a la mitad de los pocillos recubiertos una solución 5 M de ácido fólico en PBS, y a la otra mitad se añadió PBS solo. Después de 1 h a temperatura ambiente, el líquido fue retirado y a continuación se añadió a los pocillos ácido fólico en concentraciones en el intervalo de 0,1 a 2,8 nM (6 paralelos) conteniendo ³H-FA y se incubaron a 4°C durante la noche. La fracción de ácido fólico unida específicamente se determinó por un método similar al que se describe para ¹²⁵I-FBP, corrigiendo para la fracción de ³H-FA retenida en los pocillos que fueron preincubados con ácido fólico.

30

Unión de ¹²⁵I-FA-HlgG a proteína de unión con folato inmovilizada.

Los pocillos fueron incubados con una solución de FBP en PBS y lavados dos veces con PBS después de eliminar la mezcla de incubación, y subsiguientemente con una solución de HlgG en PBS (10 g/ml). A la mitad de los pocillos recubiertos se les añadió una solución 5 M de ácido fólico en PBS, y a la otra mitad se añadió solamente PBS. Al cabo de 1 h a temperatura ambiente, el líquido fue eliminado y se añadió a los pocillos ¹²⁵I-FA-HlgG en concentraciones que se encuentran en el intervalo de 0,2(4) a 13,(3) nM con respecto al conjugado de ácido fólico (5 paralelos). La ¹²⁵I-FA-HlgG unida específicamente fue determinada como se describió anteriormente para ³H-FA.

Determinación de las propiedades de unión.

La ³H-FA unida específicamente se representó gráficamente frente a la concentración de ³H-FA en una representación tipo Scatchard (Figura 1). Para la ¹²⁵I-FA-HlgG se hizo una representación similar suponiendo la presencia de al menos un derivado de ácido fólico reactivo para la unión en cada molécula de HlgG. Los valores que siguen fueron determinados a partir del ensayo de unión:

K_a se determinó a partir de la representación con ³H-FA: 2×10^8

K_a se determinó a partir de la representación con ¹²⁵I-FA HlgG: $0,5 \times 10^5$ (debe observarse que una representación de dos componentes podría ser también una posible solución para los puntos ya que si solamente se consideran los tres puntos de concentración más baja se obtendría un valor de K_a significativamente más alto).

Conclusión: El conjugado de folato-IgG radiomarcado mostró una afinidad significativa de unión hacia el receptor (proteína de unión con folato).

Ejemplo 5 (Fundamento tecnológico de la invención).**Capacidad de unión con el antígeno de TP-3 IgG y TP-1 F(ab')₂ marcadas con folato y con radioisótopo en células OHS.**

Los anticuerpos monoclonales TP-3 y TP-1 (Bruland et al., 1986) se unen a dos epítomos diferentes de un antígeno de la superficie de la célula expresado en células de osteosarcoma (Bruland et al., 1988). Estos anticuerpos fueron usados para estudiar el efecto de la conjugación con folato sobre la capacidad de los anticuerpos para unirse al antígeno *in vitro*. Células OHS fueron desarrolladas de acuerdo con métodos estándar (Larsen et al. 1994a) pero usando suero de ternera fetal al 10% en vez de al 13%. Las células fueron recolectadas, se les añadió DMSO y se congelaron a -80°C .

Métodos: TP-1 F(ab')₂ y TP-3 IgG fueron marcadas con folato (como se describió anteriormente) para obtener relaciones de folato:anticuerpo de 2:1 y 4:1 respectivamente. Versiones marcadas con folato así como no marcadas con folato de TP-3 y TP-1 F(ab') fueron subsiguientemente radiomarcadas usando N-succinimidil-3-[¹²⁵I]yodobenzoato como se describió en el ejemplo 1. Tandas congeladas de células de osteosarcoma OHS que como promedio expresaban $7,4 \times 10^5$ antígenos por célula (Larsen et al., 1994a) fueron fundidas, lavadas y centrifugadas dos veces con PBS para eliminar el DMSO y suspendidas en PBS (que contiene 1% de BSA) hasta una concentración de 4 millones de células por ml. A tubos de ensayo de 4 ml, se añadieron 0,3 ml de esta suspensión. A continuación se añadieron a los tubos 0,5 ng de uno de los cuatro conjugados ¹²⁵I-TP1 (Fab')₂-folato; ¹²⁵I-TP-1 F(ab')₂; ¹²⁵I-TP-3 IgG-folato; ¹²⁵I-TP-3 IgG. Los tubos de muestra fueron subsiguientemente incubados durante tres horas, después de lo cual los tubos se sometieron a conteo de radioactividad en un contador de NaI, se lavaron y se centrifugaron tres veces antes de que se contase la radioactividad asociada al sedimento de células. La capacidad de unión de células retenida (RCBA: Retained Cell Binding Ability) se determinó de la forma siguiente:

RCBA = fracción de unión a las células del RIC marcado con folato / fracción de unión a las células del RIC no marcado con folato

RIC: radioinmunoconjugado

Resultados: La RCBA de ¹²⁵I-TP-3 IgG-folato frente a la de ¹²⁵I-TP-3 IgG fue 0,36, mientras que la RCBA para ¹²⁵I-TP-1 F(ab')₂ -folato frente a la de ¹²⁵I-TP-1 F(ab')₂ fue 0,62. Esto indica que, aunque se perdió algo de inmunorreactividad, los anticuerpos eran aún reactivos con el antígeno asociado al osteosarcoma.

Conclusión: Los anticuerpos marcados con folato pueden reaccionar en principio tanto con el antígeno como con la proteína de unión con folato, es decir, tal conjugado posee una doble capacidad de unión.

Ejemplo 6 (Fundamento tecnológico de la invención)**Unión de anticuerpos marcados con folato y radiomarcados, con células OVCAR-3 y HELA-S3 que expresan proteína de unión con folato. Demostración de la doble capacidad de unión usando células OHS.**

Métodos: Células OVCAR-3 (carcinoma de ovario humano), HELA-S3 (carcinoma cervical humano) fueron usadas como células que expresan folato. Las células fueron cultivadas en frascos de material plástico de 75 cm³ con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero de ternera fetal, penicilina, estreptomocina y glutamina. Diez días antes de la

recolección, el medio de cultivo fue reemplazado con medio RPMI 1640 libre de folato suplementado con 10% de suero de ternera para asegurar la expresión de proteína de unión con folato antes de que las células fueran recolectadas. Se añadió DMSO a las células recolectadas y se congelaron a -80°C . Antes de su uso en los ensayos de unión las células congeladas fueron fundidas e inmediatamente se añadió PBS que contiene 1% de BSA y se lavaron y centrifugaron dos veces para eliminar el DMSO. La suspensión de células en PBS con 1% de BSA se mantuvo en hielo durante la incubación con los conjugados. Los ensayos de unión se llevaron a cabo de la forma siguiente: Se prepararon suspensiones madre de células de OVCAR-3 y HELA-S3 de 1 millón de células por ml y se añadieron 0,5 ml a tubos de ensayo de 2 ml. A los tubos se añadieron diversas cantidades de folato-anticuerpo- ^{125}I . Para determinar la unión no específica, se añadió en tubos paralelos anticuerpo ^{125}I no marcado con folato a las mismas concentraciones. Los tubos fueron incubados en agitadora durante 3 horas, se hizo el conteo de radioactividad y se lavaron. Finalmente, se contó la radioactividad asociada con el sedimento de células. Fueron evaluados los conjugados siguientes: folato-TP-1 F(ab') $_2$ - ^{125}I (~2 folatos por molécula de anticuerpo, marcado con SIB (SIB = N-succinimidil-3-[^{125}I])yodobenzoato), 50 MBq/mg); TP-1 F(ab') $_2$ - ^{125}I (marcado con SIB, 90 MBq/mg); folato-TP-3-IgG- ^{125}I (~4 folatos por molécula de anticuerpo, marcado con SIB, 70 MBq/mg); TP-3-IgG- ^{125}I (marcado con SIB, 120 MBq/mg) folato-HlgG- ^{125}I (marcado con yodógeno, 400 MBq/mg).

Se llevó a cabo un experimento adicional incubando folato-TP-3-IgG- ^{125}I y TP-3-IgG- ^{125}I con células OHS y usando los datos para TP-3-IgG- ^{125}I incubado con HELA-S3 como control no específico.

Resultados: Los datos preliminares indican que hay al menos dos tipos de interacción con proteína de unión con folato. Una que tiene una alta afinidad y satura a baja concentración (típicamente por debajo de 50 ng/ml). Se determinó K_{as}' en el intervalo de 10^{10} a 10^{12} con los limitados datos disponibles a estas bajas concentraciones (Figuras 2 - 4). En un ensayo de un punto, usando 0,1 ng/ml de concentración de folato-TP-3-IgG- ^{125}I (y 0,1 ng de TP-3-IgG- ^{125}I como control de la unión no específica) y 5×10^5 células OVCAR-3 en 0,5 ml, se encontró que el 67% de folato-anticuerpo-radionucleido estaba unido específicamente a las células. A concentraciones más altas parece tener lugar unión de afinidad más baja (Figura 5). La saturación de la unión no parece tener lugar ni siquiera para concentraciones de conjugado en el margen de $\mu\text{g/ml}$. La unión con la célula parece aumentar linealmente con los aumentos de la concentración en el medio de conjugados de folato-anticuerpo-radionucleido. Debe observarse que la absorción específica para folato-TP-3-IgG- ^{125}I en OHS era similar a la obtenida en HELA-S3 y OVCAR-3 cuando se corrigen para la unión no específica (Figura 5). La afinidad de folato-TP-3-IgG- ^{125}I (4 folatos por anticuerpo) fue comparada con la de TP-3-IgG- ^{125}I no marcado con folato (Figura 6). Ambas versiones de TP-3 tenían una afinidad significativa hacia las células OHS. Los datos indican una reducción en K_n de aproximadamente cinco para la versión marcada con folato en comparación con la versión no marcada con folato del anticuerpo TP-3 IgG, probablemente debida a una modificación de la lisina en los sitios de combinación del antígeno.

Conclusión: Los conjugados de folato-anticuerpo-radionucleido muestran una unión significativa a la proteína de unión con folato (FBP) en células lo que indica que estos conjugados pueden ser usados para marcar como diana *in vivo* células tumorales que expresan FBP. También, como se demuestra por la unión específica de folato-TP-3-IgG- ^{125}I a células OHS antígeno-positivas así como células HELA-S3 y OVCAR-3 FBP-positivas, los conjugados de folato-anticuerpo-radionucleido pueden poseer doble capacidad de unión.

BIBLIOGRAFIA

- Bruland, Ø, Fodstad, Ø, Stenwig, A E y Pihl, A. Expression and characteristics of a novel human osteosarcoma-associated cell surface antigen. *Cancer Res* 48, 5302-5309 (1988).
- Bruland, Ø, Fodstad, Ø, Funderud, S y Pihl, A. New monoclonal antibodies specific for human sarcomas. *Int J Cancer* 38: 27-31 (1986).
- 5 Bruland, ØS. Cancer therapy with radiolabelled antibodies. An overview. *Acta Oncol* 34, (8) 1085-1094, (1995).
- Campbell, I G, Jones, T A, Foulkes, W D, Trowsdale J. Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res* 51, 5329-5338 (1991).
- Fraker, P J y Speck Jr. J C Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramine, 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3a, 6a-diphenyl glucoluril. *Biochem Biophys Res Comm* 80, 849-855 (1978).
- 10 Kranz, D M, Roy, E J y Patrick, T A, Conjugates of folate anti-effector cell antibodies, U.S. Pat. No. 5,547,668 (Ag. 20, 1996).
- Larsen, R H, Bruland, ØS, Hoff, P, Alstad, J, Lindmo, T y Rofstad, E K. Inactivation of human osteosarcoma cells in vitro by ^{211}At -TP-3 monoclonal antibody: Comparison with astatine-211-labelled bovine serum albumine, free astatine-211 and external beam X rays. *Radiat Res* 139, 178-184 (1994a).
- 15 Larsen, R H, Hoff, P, Alstad, J y Bruland, ØS. Preparation and quality control of ^{211}At -labelled and ^{125}I -labelled monoclonal antibodies. Biodistribution in mice carrying human osteosarcoma xenografts. *J Labelled Compds Radiopharmaceuticals*. 34 (8): 773-785 (1994b).
- Larsen, R H, Hoff P, Vergote, I B, Bruland, ØS, Aas, M, De Vos, L y Nustad, K. α -particle radiotherapy with ^{211}At -labelled monodisperse polymer particles, ^{211}At -labelled IgG proteins, and free ^{211}At in a murine intraperitoneal tumour model
- 20 *Gynecol Oncol*. 57: 9-15 (1995).
- Mathias, C J, Wang, S., Waters, D J, Turek, J J, Low, P S y Green, M A. Indium-111-DTPA-Folate as a potential folate receptor targeted radiopharmaceutical. *J Nucl Med* 39: 1579-1585 (1998).
- Meredith, R F, Khazaeli, M B, Plott, W E, LIU, T., Russel, C D, Wheeler, R H y Lobuglio, A F. Effect on human immune-response on repeat courses of I-131 chimeric B72.3 antibody therapy. *Antibody. Immunoconj Radiopharm* 6 (1), 39-46
- 25 (1993).
- Reddy, J A y Low, P S. Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 15 (6): 587-627 (1998).
- Shinoda, T, Takagi, A, Macda, A, Kagatani, S, Konno, Y y Hashida, M. In vivo fate of folate-BSA in non-tumour- and tumour-bearing mice. *J Pharm Sci* 87 (12): 1521-1526, 1998.
- 30 Trippett, T M y Bertino, J R. Therapeutic strategies targeting proteins that regulate folate and reduced folate transport. *J Chemotherapy* 11: 3-10 (1999).

REIVINDICACIONES

- 1^a.Un conjugado de unión con un receptor, que consiste en:
- i) Un anticuerpo o anticuerpos humanos, o fragmentos o construcciones de los mismos,
 - ii) un radionucleido o una mezcla de radionucleidos,
 - 5 iii) un folato unido químicamente al componente (i), en el que dicho anticuerpo o anticuerpos, o fragmentos o construcciones de los mismos en el conjugado retienen una capacidad para combinación de antígeno significativa.
- 2^a.Un conjugado según la reivindicación 1^a, en el que dicho conjugado tiene una doble capacidad de unión con una diana.
- 10 3^a.Un conjugado según la reivindicación 2^a, en el que dicho anticuerpo humano, fragmento de anticuerpo o construcción de anticuerpo tiene afinidad hacia un antígeno distinto de la proteína de unión con folato.
- 4^a.Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 3^a, en el que dicho anticuerpo humano, fragmento de anticuerpo o construcción de anticuerpo es monoclonal.
- 5^a.Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 3^a, en el que dicho anticuerpo humano, fragmento de anticuerpo o construcción de anticuerpo es policlonal.
- 15 6^a.Un conjugado según la reivindicación 1^a, en el que dicho conjugado no tiene una doble capacidad de unión con una diana.
- 7^a.Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 6^a, en el que cada uno de dichos anticuerpos es de la clase de IgG o IgM.
- 20 8^a.Un conjugado según la reivindicación 1^a, en el que cada uno de dichos anticuerpos es policlonal, de la clase de IgG y en el que dicha construcción no tiene doble capacidad de unión.
- 9^a.Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 8^a, en el que dicho radionucleido o dicha mezcla de radionucleidos se eligen cada uno de ellos entre el grupo que consiste en emisores alfa, emisores beta, emisores gamma, emisores de positrones y emisores de rayos X.
- 25 10^a.Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 8^a, en el que dicho radionucleido o dicha mezcla de radionucleidos es útil para cirugía radioguiada.
- 11^a.Un conjugado según la reivindicación 9^a, en el que dicho radionucleido o dicha mezcla de radionucleidos se eligen cada uno de ellos entre el grupo de emisores alfa que consiste en ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹²Pb, ²²⁵Ac, ²²³Ra, ²²⁴Ra y ²²⁷Th.
- 12^a.Un conjugado según la reivindicación 9^a, en el que dicho radionucleido o dicha mezcla de radionucleidos se eligen cada uno de ellos entre el grupo de emisores beta que consiste en ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁵³Sm.
- 30 13^a.Un conjugado según la reivindicación 9^a, en el que dicho radionucleido o dicha mezcla de radionucleidos es cada uno de ellos ²¹¹At o ¹²⁵I.
- 14^a.Un método para preparar un conjugado de receptor según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 13^a, comprendiendo dicho método:
- a) generar un éster activado en las posiciones α- o γ-carbonilo del folato y a continuación acoplarlo a un anticuerpo humano, un fragmento de anticuerpo o una construcción de anticuerpo;
 - 35 b) acoplar un agente radioactivo a un anticuerpo humano, un fragmento de anticuerpo o una construcción de anticuerpo mediante acoplamiento amina o marcaje con yodógeno de tirosina;
- en donde la etapa de acoplamiento a) puede realizarse antes, al mismo tiempo o después de la etapa de acoplamiento b).
- 40 15^a.Un método según la reivindicación 14^a, en el que la etapa de acoplamiento a) se lleva a cabo de forma que una unidad de folato se une a dicho anticuerpo, fragmento de anticuerpo o construcción de anticuerpo, y en el que dicho agente radioactivo es un radionucleido útil para radioterapia.
- 16^a.Un método según la reivindicación 14^a o según la reivindicación 15^a, en el que el acoplamiento de la etapa b) se lleva a cabo por medio de un enlazador.
- 45 17^a.Un método según la reivindicación 14^a o según la reivindicación 15^a, en el que el acoplamiento de la etapa b) se lleva a cabo sin usar un enlazador.

- 18^a. El uso de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 13^a para la elaboración de una solución farmacéutica adecuada para inyección o infusión a mamíferos.
- 19^a. El uso según la reivindicación 10^a, en el que dicha solución farmacéutica es adecuada para inyección o infusión en mamíferos por al menos una vía de administración elegida entre las vías intravenosa, regional e intratumoral.
- 5 20^a. El uso según la reivindicación 18^a o la reivindicación 19^a para la elaboración de una solución farmacéutica para la formación de imágenes de células que contienen receptores.
- 21^a. El uso según la reivindicación 18^a o la reivindicación 19^a para la elaboración de una solución farmacéutica para suministrar radiación potencialmente terapéutica a células malignas o tejido maligno que expresan al menos un receptor de unión de folato.
- 1.0 22^a. El uso según la reivindicación 21^a en el que dicho tejido maligno es cáncer de cerebro, pulmón, cuello del útero, ovario o mama.
- 23^a. El uso según la reivindicación 18^a o la reivindicación 19^a para la elaboración de una solución farmacéutica para ser usada en combinación con uno o más tratamientos elegidos entre la administración de IgG, IgM o fragmentos de las mismas, marcadas con folato y radiomarcadas y varios radioinmunoconjugados, otras formas de terapia radiofarmacéutica, quimioterapia, terapia de haz externo y cirugía, para tratar estados malignos que expresan la proteína de unión con folato.
- 1.5

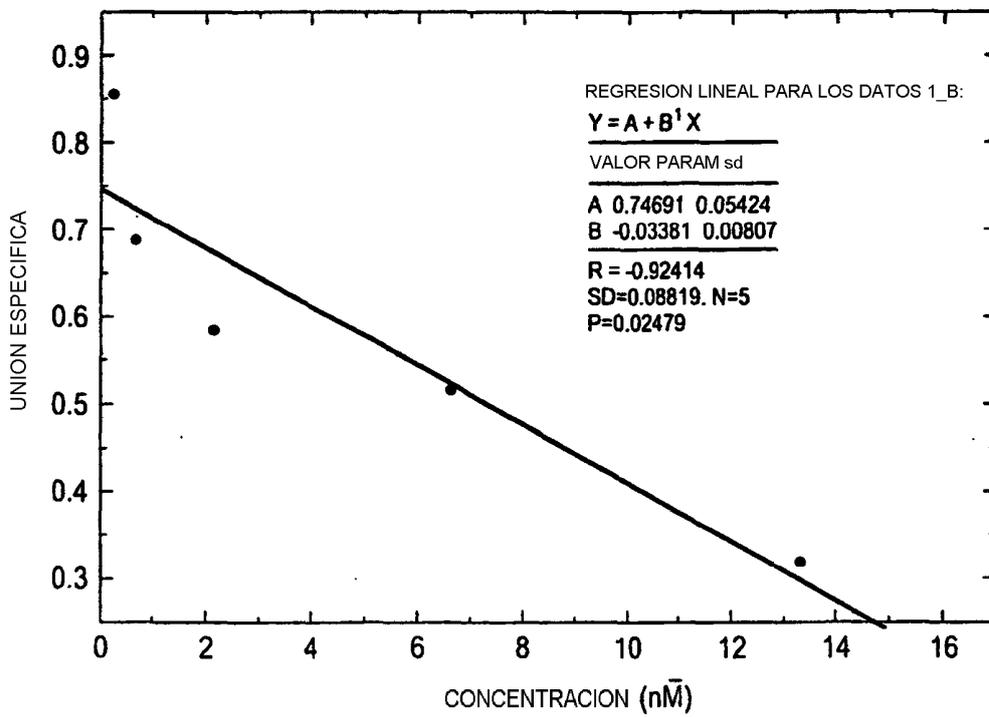
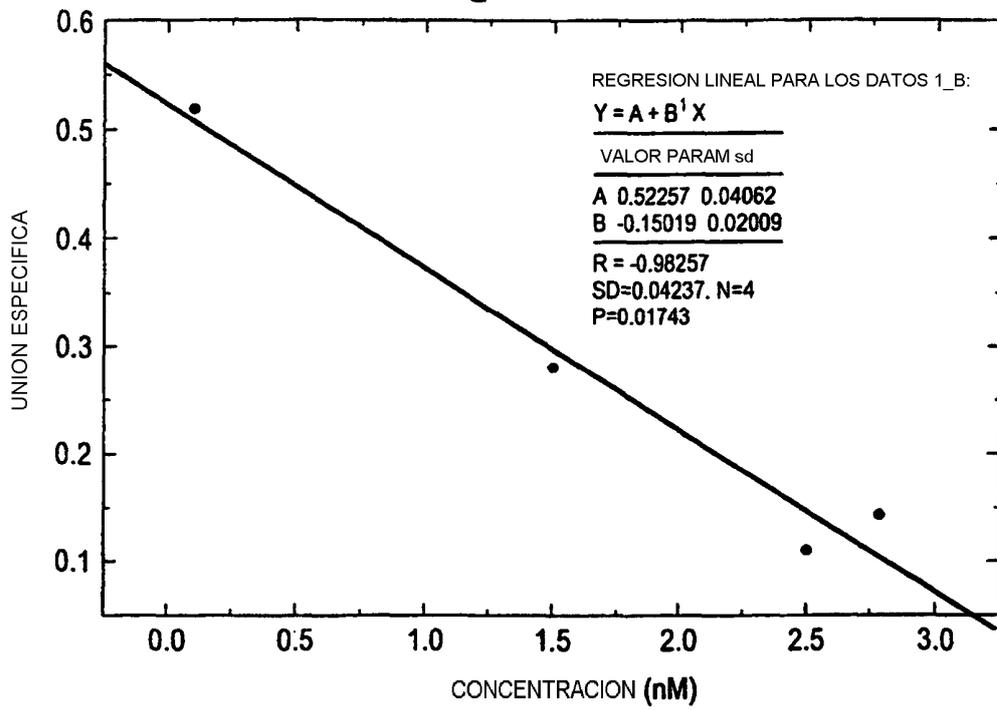


Fig. 1

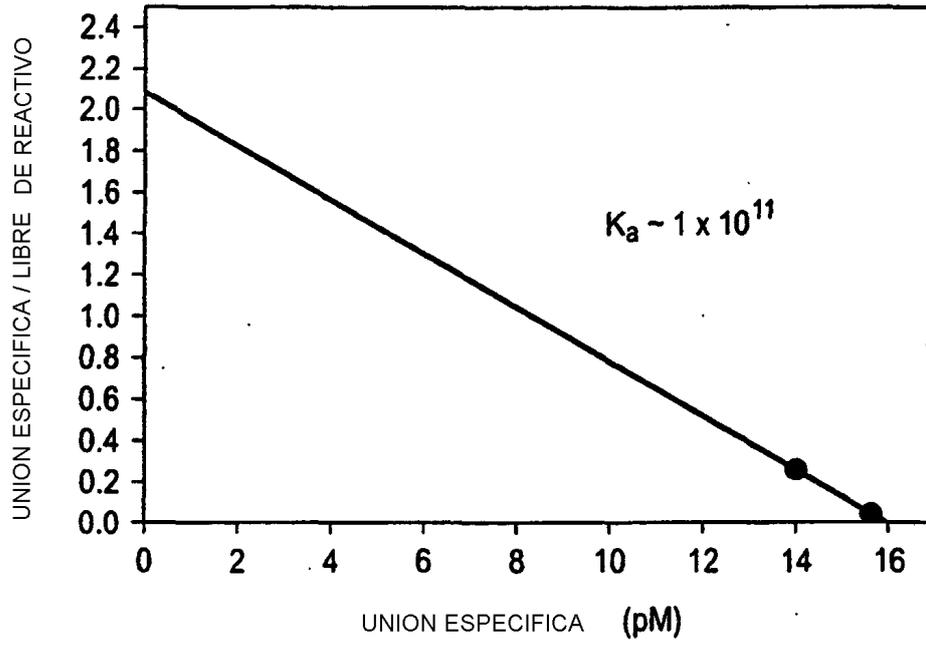


Fig.2

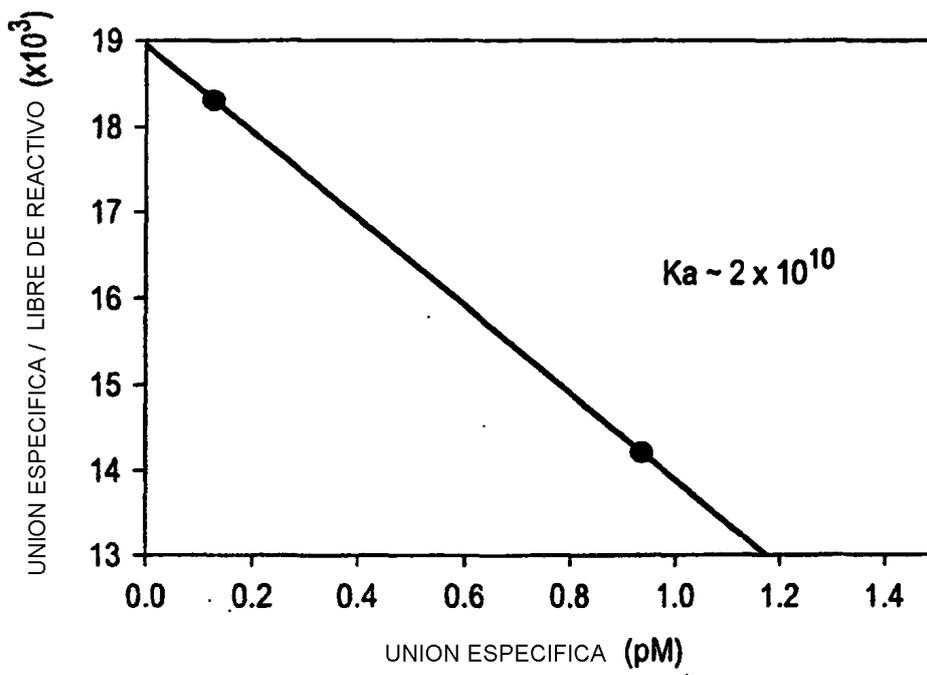


Fig.3

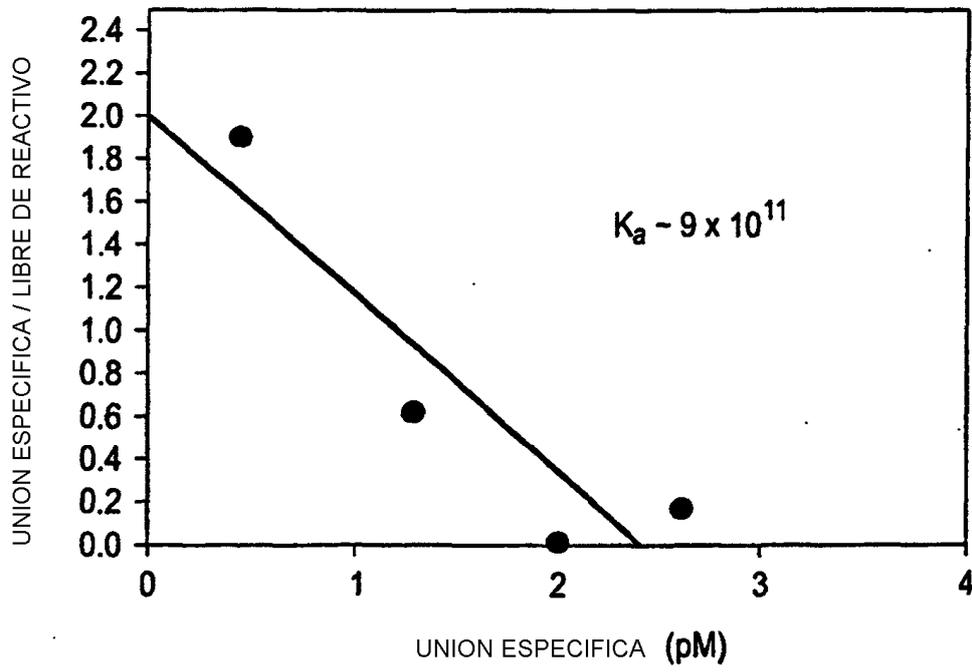


Fig.4

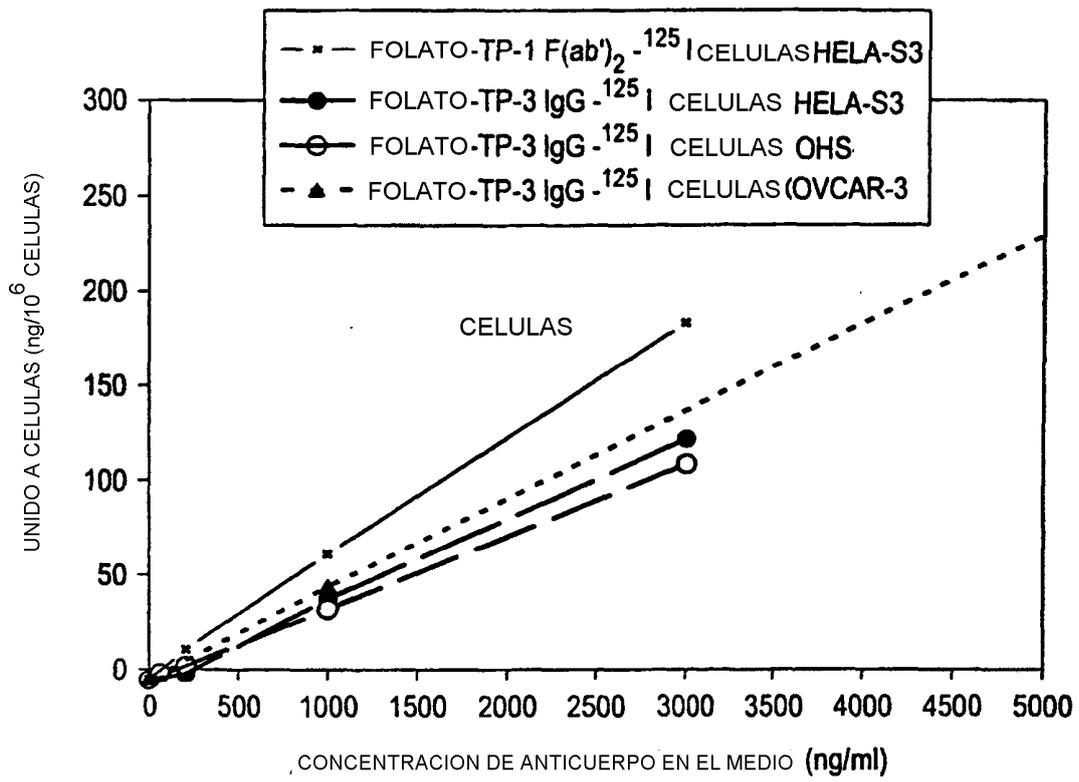


Fig.5

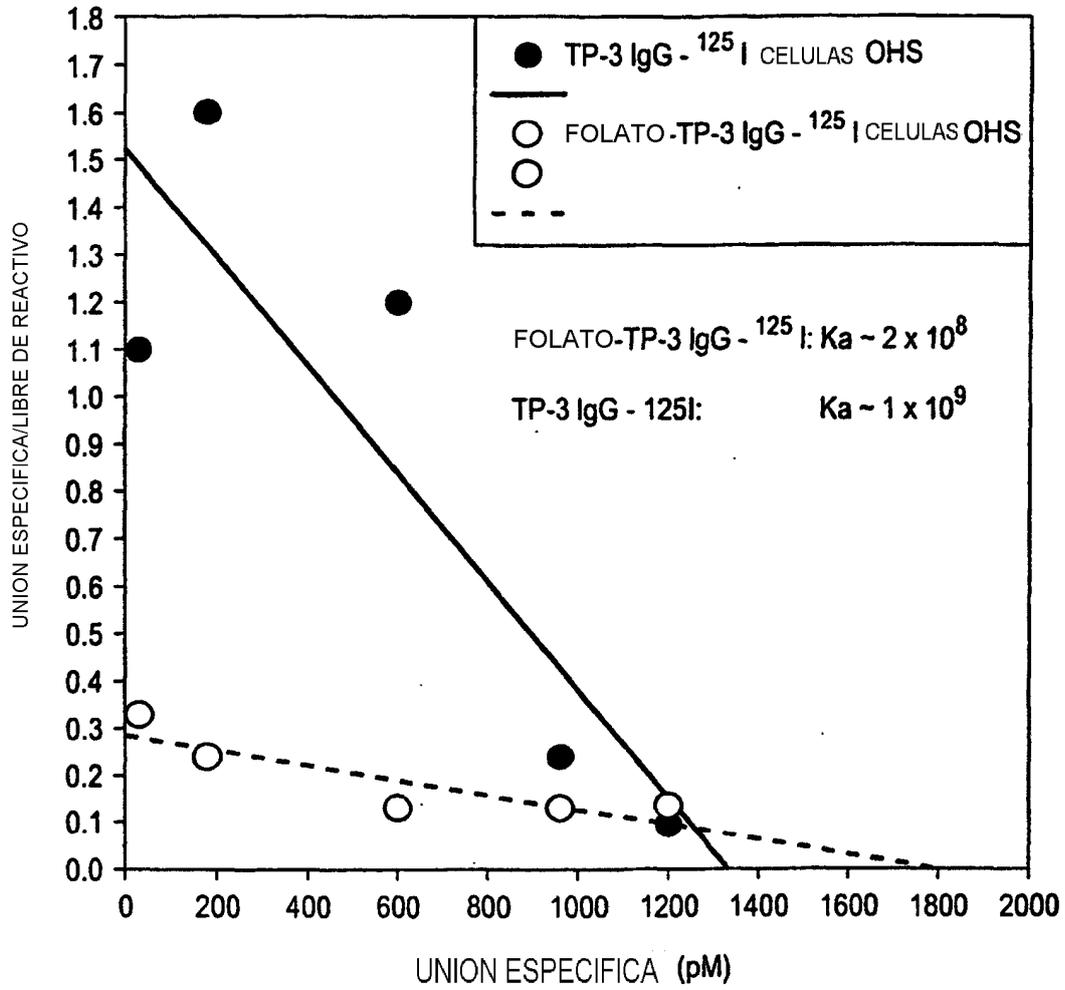


Fig.6