

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 085**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06010902 .2**
96 Fecha de presentación: **27.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1859811**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54 Título: **UTILIZACIÓN DE CONJUGADOS DE AMATOXINAS O FALOTOXINAS CON
MACROMOLÉCULAS PARA LA TERAPIA TUMORAL Y DE LA INFLAMACIÓN.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.12.2011

73 Titular/es:
**FAULSTICH, HEINZ, DR.
GREIFSTRASSE 21
69123 HEIDELBERG, DE y
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM**

72 Inventor/es:
**Faulstich, Heinz;
Faulstich, Dorian;
Anderl, Jan Dr. y
Moldenhauer, Gerhard Dr.**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 371 085 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

Utilización de conjugados de amatoxinas o falotoxinas con macromoléculas para la terapia tumoral y de la inflamación.

5 Las amatoxinas (α -amanitina, β -amanitina, amanina) son péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos. Pueden aislarse del hongo *Amanita phalloides* o bien elaborarse a partir de unidades estructurales por síntesis. Las amatoxinas inhiben de forma específica la ARN polimerasa II dependiente de ADN de las células de los mamíferos y, debido a ello, detienen la transcripción y la biosíntesis de las proteínas de las células afectadas. La inhibición de la transcripción provoca la detención del crecimiento y la proliferación de la célula. A pesar de carecer de enlaces covalentes, el complejo formado entre la amanitina y la ARN polimerasa II es muy fuerte ($K_D = 3$ nM). La disociación de la amanitina de la enzima es un proceso muy lento, que hace que la recuperación de la célula afectada sea poco probable. Cuando en una célula la inhibición de la transcripción dura demasiado, la célula sufre una muerte celular programada (apoptosis), tal y como se demuestra en cultivos de células Jurkat incubadas con α -amanitina o, con mucha mayor eficacia, en células Jurkat incubadas con oleato de O-metil- α -amanitina, un compuesto que consigue atravesar la membrana (resultados propios, no publicados).

20 Las falotoxinas (faloidina, falacidina o aminofaloidina) son péptidos cíclicos compuestos de 7 aminoácidos. Se unen específicamente a la proteína del citoesqueleto actina en su forma polimérica (microfilamentos). Impiden así la despolimerización de los microfilamentos y alteran el funcionamiento del citoesqueleto de actina. Dicho citoesqueleto es una densa malla de microfilamentos que, bajo el control de las proteínas asociadas a la actina, está sometido a rápidos ciclos de estructuración y desestructuración fundamentales para los procesos dinámicos como la división y la migración celular. Asimismo, se cree que la invasión por células metastásicas es un proceso dependiente de la actina. En las células cancerígenas, las perturbaciones estructurales y funcionales del citoesqueleto de actina pueden estar relacionadas con mayores tasas de proliferación y un movimiento no controlado. Las moléculas que actúan sobre el citoesqueleto de las células tumorales inhiben la división celular y provocan la muerte programada de la célula. Las falotoxinas que pueden atravesar la membrana como el oleato de faloidina, desencadenan la apoptosis en cultivos de células Jurkat, como se ha demostrado en el laboratorio en el contexto de la presente invención (no publicado).

30 Los índices de penetración de las amatoxinas y falotoxinas naturales a través de las membranas celulares son bajos. Por este motivo, la mayoría de los tipos de células de mamíferos están protegidos frente a las amatoxinas y las falotoxinas. No obstante, las células parenquimatosas del hígado poseen sistemas de transporte (proteínas transportadoras de aniones orgánicos, OATP), que facilitan la captación de las toxinas en los hepatocitos. La presencia de estos sistemas de transporte hepáticos explica por qué en los casos de envenenamiento en seres humanos por ingesta de amanita las células afectadas sean sobre todo los hepatocitos, y que los hepatocitos de ratón, rata y ser humano, entre otros, fueran hasta el momento los modelos más utilizados para estudiar las actividades biológicas de las amatoxinas y las falotoxinas. Una vez declaradas como hepatotoxinas, la manifiesta toxicidad hepática de las amatoxinas y las falotoxinas, ha hecho desestimar todos los planes encaminados a utilizar las toxinas como fármacos en la terapia tumoral.

45 Según la presente invención, las amatoxinas y las falotoxinas se pueden convertir en medicamentos para la terapia tumoral uniéndolas de forma covalente a macromoléculas. Los conjugados de toxinas resultantes están compuestos de 2 componentes.

Conjugados portador-toxina

La toxina se selecciona de entre las amatoxinas.

50 Las amatoxinas son péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos, aisladas del hongo *Amanita phalloides* y descritas en la ref. (Wieland, T. y Faulstich H., Crit. Rev. Biochem. 5, (1978), 185-260); además, todos sus derivados químicos; además, todos sus análogos semisintéticos; además, todos sus análogos sintéticos obtenidos a partir de unidades estructurales según la estructura principal de los compuestos naturales (cíclica, 8 aminoácidos). Desde el punto de vista funcional, las amatoxinas se definen como péptidos o depsipéptidos que inhiben la ARN polimerasa II de mamífero. Las amatoxinas preferidas son las que presentan un grupo funcional (por ejemplo, un grupo carboxílico, un grupo amino, un grupo tiol o un grupo de captación de tiol) que pueda reaccionar con moléculas conectoras o portadoras.

60 Otras toxinas conocidas en la técnica son las falotoxinas. Las falotoxinas son péptidos cíclicos compuestos por 7 aminoácidos, aisladas a partir del hongo *Amanita phalloides* y descritas en la ref. (Wieland, T. y Faulstich H., Crit. Rev. Biochem. 5, (1978), 185-260). Además, todos sus derivados químicos; además, todos sus análogos semisintéticos; además, todos sus análogos sintéticos obtenidos a partir de unidades estructurales según la estructura principal de los compuestos naturales (cíclica, 7 aminoácidos). En términos funcionales, las falotoxinas se definen como péptidos o depsipéptidos que se unen a la actina polimérica e inhiben la despolimerización de los microfilamentos. Las falotoxinas preferidas son las que presentan un grupo funcional (por ejemplo, un grupo carboxílico, un grupo amino, un grupo tiol o un grupo de captación de tiol) que puede reaccionar con moléculas

conectoras o portadoras.

El portador comprende un anticuerpo monoclonal específico de tumor que se une a las células tumorales o es absorbido por éstas.

5

Los portadores preferidos tienen una masa molar de entre 20 y 300 kDa.

La relación molar preferida toxina : portador es de 1-15 : 1.

10

La vía de administración preferida de los conjugados de toxinas es intravenosa o intraperitoneal.

La aplicación preferida de los conjugados de toxinas es en tratamientos antitumorales y antiinflamatorios.

15

La dosis preferida en seres humanos es de 10-100 µg/kg de peso corporal.

La aplicación preferida es de 1 mg de toxina /100 ml al 0,9 % de NaCl.

20

Los conjugados de toxinas también se utilizan como herramientas en la investigación de la biología celular. Tanto las amatoxinas como las falotoxinas ejercen su actividad tóxica, como se ha descrito anteriormente, exclusivamente en el citoplasma o en el núcleo de las células, por lo que tienen que atravesar la membrana celular. Por este motivo, los efectos tóxicos en la célula se utilizan para indicar la interiorización de la macromolécula utilizada en dicha célula.

25

También se dan a conocer conjugados de amatoxinas con albúmina. Preferentemente afectan a las células consumidoras de proteínas, como las células sinusoidales del hígado o los macrófagos (Barbanti-Brodano y Fiume, Nature New Biol. 1973, 243, 281-3). En combinaciones de macrófagos y linfocitos, por ejemplo, la albúmina-β-amanitina provocaba la extinción selectiva de los macrófagos y dejaba los linfocitos intactos. Por otro lado, la albúmina-β-amanitina era tolerada en ratas en concentraciones que permitían la formación de anticuerpos específicos contra la amanitina en dichos roedores. En experimentos similares, se produjeron anticuerpos específicos contra la amanitina en conejos mediante el uso de conjugados de fetuína-β-amanitina. Las proporciones de toxina:portador utilizadas en la técnica anterior fueron 3-17:1.

30

Se ha descubierto que la toxicidad de los conjugados de albúmina-amanitina puede reducirse en gran medida modificando las condiciones de unión. Se procedió a preparar un conjugado de albúmina de suero humano y β-amanitina utilizando un éster de β-amanitina-N-hidroxisuccinimida, sin carbodiimidas ni el método del anhídrido mixto, junto con una proporción mucho menor de toxina:albúmina. Cuando la concentración de amanitina (c) en estos conjugados de albúmina se determinó mediante espectrometría u.v. utilizando la fórmula:

35

$$C_{\text{amanitina}} [\mu\text{g/ml}] = 1/13,5 \times (E_{310} - 0.05 E_{280}) \times 918$$

40

(en la que E_{310} y E_{280} son los valores de absorbancia del conjugado de albúmina a 300 nm y 280 nm, respectivamente), se descubrió que, como promedio, alrededor de 1 molécula de toxina se unía a la albúmina. Este procedimiento, junto con el especial cuidado en evitar la desnaturalización y/o la dimerización del componente de la albúmina, redujo la toxicidad de los nuevos conjugados de amanitina-albúmina en ratones en un factor de 10, respecto a anteriores preparados de conjugados de albúmina y β-amanitina.

45

Para la preparación de un conjugado de amatoxina-albúmina, se disolvieron 2 µmol de β-amanitina (secada *al vacio* sobre P_4O_{10}) en 20 µL de dimetilformamida. A esta solución se le añadieron 14 µmol de N-hidroxi-succinimida sólida y 3,6 µmol de dicitohexilcarbodiimida sólida. La mezcla se dejó reaccionar durante 12 horas a temperatura ambiente, y se procedió a separar la dicitohexilurea cristalizada. El éster de β-amanitina-N-hidroxisuccinimida se hizo precipitar con la adición de 1-2 mL de dietiléter anhidro, y se procedió a aislar dicho precipitado por centrifugación. La mezcla, disuelta en 2,2 mL de albúmina de suero humano (10% en PBS, 3,2 µmol), se agitó suavemente a 4°C durante la noche. El éster de β-amanitina-N-hidroxisuccinimida que no había reaccionado fue separado del conjugado de toxina-albúmina mediante filtración en gel con Sepadex G25, empleando PBS como disolvente. La solución se concentró por ultrafiltración en conos de centrifuga, se esterilizó y se conservó a 4°C. La proporción toxina:albúmina estaba comprendida en el intervalo de 0,5-1:1.

55

El nuevo conjugado de albúmina-β-amanitina se analizó para determinar su actividad antitumoral mediante el carcinoma 256 de Walker en ratas como modelo de tumor. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640, con un 10% de suero fetal bovino y 2 mM de glutamina, y los cultivos se dividieron 2 veces por semana (1:2). Las células se centrifugaron en PBS, se lavaron y se transplantaron (5×10^6 células/200 µl) en una pata trasera de ratas Sprague-Dawley hembras. El tumor era palpable al cabo de 4 ó 5 días, momento en el que se inició el tratamiento. Los animales recibieron 75 µg/kg de peso corporal (75 µg de β-amanitina unida a albúmina) por vía intravenosa 2 veces a la semana. Tras 3 inyecciones, el tratamiento se interrumpió porque los animales habían perdido peso y sufrían diarrea. El crecimiento del tumor se medía cada día, y es representado en la figura 1. Mientras que los animales de control mostraron un aumento en el volumen del tumor de un 500% en el día 9 (en aquel momento, los animales de

65

control fueron sacrificados porque la pata se paralizó), 2/3 de los animales tratados con amanitina experimentaron una interrupción en el crecimiento del tumor en el día 4, con un volumen de éste de entre el 220 y el 240%. En el día 6, los tumores de estos animales se difuminaron y desaparecieron el día 10. Los animales supervivientes se observaron durante 14 días más, durante los cuales se recuperaron completamente. Volvieron a adquirir un peso corporal normal y vivieron hasta que fueron sacrificados (otras 2 semanas) sin que el tumor volviese a aparecer. Otro grupo de animales tratados con una dosis de 30 µg/kg de peso corporal no mostró efecto alguno; estos animales fueron sacrificados el día 9, junto con los animales de control (figura 1).

La actividad específica contra el tumor de la amanitina unida a la albúmina se comprende al considerar dos observaciones efectuadas recientemente en tumores sólidos: 1. Debido al hecho de que los tumores sólidos, especialmente los de crecimiento rápido, sufren un déficit de nutrientes, aminoácidos, etc., y, por lo tanto, absorben proteínas, especialmente albúmina, del tejido circundante de una forma mucho más eficaz que las células normales. 2: Por el hecho de que los tumores sólidos causan reacciones de inflamación en sus inmediaciones, lo cual desemboca en la perforación de los capilares y en un derrame de proteínas del plasma en el tejido (potenciación de la permeabilidad y la retención, EPR por sus siglas en inglés). Ambos efectos contribuyen a una absorción preferida de la albúmina por parte de los tumores sólidos. Aunque esté unida a la amanitina, la albúmina se convierte en un vehículo que permite suministrar la toxina a las células tumorales. Una vez dentro de la célula, el vehículo se degrada por la acción de las proteasas en el compartimento endosómico/lisosómico, y la toxina, que es totalmente resistente a estas enzimas, es liberada en el citoplasma en forma activa. Las pruebas de este suministro de ligandos mediado por la albúmina en tumores sólidos fueron facilitadas por H. Kremer, el cual, mediante una gammagrafía de cuerpo entero en ratas, demostró que en el carcinoma 256 de Walker se acumulaba un conjugado de albúmina y [¹¹¹In]-DTPA (20% de la dosis aplicada), mientras que el resto del cuerpo estaba limpio, excepto en la región del corazón/hígado, que representaba el 80% de la radiactividad 2 días después de la administración intravenosa (H. Kremer, Habilitationsschrift, Heidelberg, 2002). Por la misma preferencia, se está utilizando satisfactoriamente un conjugado de albúmina con fluoresceína para diferenciar, bajo luz ultravioleta, el tejido tumoral del tejido normal en el cerebro antes y durante la neurocirugía. (H. Kremer, Habilitationsschrift, Heidelberg, 2002).

El suministro específico al tumor de fármacos mediante el acoplamiento de dichos fármacos a la albúmina fue muy estudiado en el laboratorio de G. Stehle, H. Sinn y A. Wunder. Estos investigadores demostraron, en relación con el metotrexato y algunos otros fármacos antitumorales consolidados, que la absorción de estos medicamentos por los tumores sólidos resultaba incrementada, al tiempo que la toxicidad general disminuía, cuando los fármacos se conjugaban con la albúmina (Eschen, N., et al., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2002, 40:564-6; Weigand, M., et al., *Anticancer Drug Des.*, 2001, 16, 227-37; Schlicker, A., et al., *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 2000, 54, 442-8; Stehle, G., et al., *Anticancer Drugs*, 1999, 10, 785-90; Wunder et al., *Int. J. Cancer* 1998, 10, 884-90). El trabajo presentado difiere de los hallazgos anteriores en que el metotrexato, el cisplatino y el resto de medicamentos utilizados por Sinn y colaboradores son fármacos antitumorales de por sí. La conjugación de estos medicamentos con la albúmina modula la farmacocinética de dichos fármacos y, así, se reduce la toxicidad general. A diferencia de lo expuesto, la amanitina no es un fármaco antitumoral; sólo consigue esta nueva cualidad de para la terapia tumoral cuando se conjuga con la albúmina o con otras macromoléculas.

Además de las proteínas como la albúmina o las globulinas séricas, que no encuentran receptores específicos sobre la superficie de las células tumorales, se da a conocer en la presente memoria cómo utilizar terapéuticamente los conjugados de amatoxinas y falotoxinas con proteínas, que se unen fuertemente a receptores situados sobre la membrana celular de las células tumorales, como por ejemplo anticuerpos monoclonales dirigidos contra estructuras específicas situadas en la superficie de las células tumorales.

Se conjugaron anticuerpos monoclonales con un éster de β-amanitina-N-hidroxisuccinimida mediante la incubación del anticuerpo en PBS (2 mg/mL) con 10-30 equivalentes del derivado activado de la β-amanitina a 4°C y con un agitación suave. Tras la reacción durante 16 horas, el derivado de la proteína se separó de la amanitina que no había reaccionado mediante cromatografía de filtración en gel con Sephadex G25, utilizando PBS como disolvente. Las fracciones de proteínas combinadas se concentraron hasta una concentración de la proteína de 2 mg/mL y una concentración de la toxina de aprox. 5 x 10⁻⁵M. La proporción toxina:anticuerpo monoclonal estaba comprendida en el intervalo de 5-15:1.

Se analizaron tres líneas celulares diferentes, a saber: MCF-7, Jurkat y Raji, que contienen los receptores específicos EpCAM, CD3 y CD71, respectivamente, para comprobar la inhibición de la proliferación por la acción de los conjugados de anticuerpo monoclonal con β-amanitina, seguida de la incorporación de [³H]-timidina. Se demostró que el conjugado de amanitina con el anticuerpo monoclonal específico del receptor EpCAM (HEA 125) inhibía la proliferación de las células MCF-7 2.700 veces más que el conjugado de amanitina con un anticuerpo monoclonal inespecífico (ALH419), (figura 2). Asimismo, el conjugado de amanitina con el anticuerpo monoclonal específico del receptor CD3 (OKT3) propiciaba una inhibición de la proliferación de las células Jurkat 330 veces mayor que el conjugado de amanitina con un anticuerpo monoclonal no específico (ALH-419), (figura 3). Finalmente, se descubrió que el conjugado de amanitina con el anticuerpo monoclonal contra el receptor CD71 (PA-1) generaba una inhibición de la proliferación de las células Raji 70 veces mayor que el conjugado de amanitina con un anticuerpo monoclonal específico para CD3, que no se encuentra en las células Raji (figura 4). En todos los casos, el conjugado de amanitina con un anticuerpo específico era claramente más tóxico para la estirpe celular correspondiente que la

amanitina libre o que la amanitina conjugada con anticuerpos no específicos.

5 Para la preparación de los derivados macromoleculares de las falotoxinas, a saber, faloidina y falacidina, se disolvieron 2,0 mmol de cloruro de ácido tolueno-4-sulfónico en 400 μ l de cloroformo y se añadieron a 0,127 mmol de faloidina o falacidina disuelta en 1 ml de piridina enfriada en hielo, gota a gota, con agitación. Transcurridos 30 minutos, la reacción se detuvo por la adición de 20 ml de dietiléter. El precipitado se lavó con otros 20 ml de dietiléter y se separó por cromatografía en Sephadex LH20, con un rendimiento total del 68%. Para su reacción con amoníaco, 0,42 mmol de monotosil-faloidina o monotosil-falacidina se hicieron reaccionar con 40 ml de amoníaco en metanol (2,5 N) enfriado en hielo, y se evaporaron tras 120 minutos. El rendimiento de la aminofaloidina y de la amino-falacidina fue de aproximadamente 90%. Para su acoplamiento con las macromoléculas, los derivados de la toxina portadores del grupo amino funcional se hicieron reaccionar con el reactivo homobifuncional de enlace cruzado ditiobis-(succinimidilpropionato, DSP). Para ello, se disolvieron 248 μ moles de DSP en 1,0 ml de dimetilformamida, y se añadieron a 63 μ moles de aminofaloidina secada. La reacción comenzó con 2 μ l de trietilamina y se desarrolló bajo agitación magnética durante 16 horas a temperatura ambiente. El producto de la reacción se hizo precipitar con 10 ml de dietiléter y se centrifugó, el sedimento se disolvió en 5 ml de metanol y se desarrolló en una columna de Sephadex-LH20 con metanol. El rendimiento de la DSP-faloidina o la DSP-falacidina fue de aproximadamente el 80%, mientras que la pureza mínima fue del 90%. Para su reacción con las macromoléculas, se disolvieron 7 mg de DSP-faloidina en 0,5 ml de dimetilformamida, y se añadieron a la macromolécula disuelta en 0,5 ml de PBS. Tras la reacción durante 16 horas a temperatura ambiente, los productos con alto peso molecular se separaron mediante cromatografía de filtración en gel con Sephadex G25, utilizando NaCl al 0,1% como disolvente. Tras la liofilización, el rendimiento se determinó midiendo la absorción característica de la faloidina y la falacidina a 300 nm ($\epsilon=10^4$). Se calculó que con la polilisina, por ejemplo, uno de cada 10 residuos de lisina se conjugaba con la aminofaloidina o la aminofalacidina.

25 La citotoxicidad de los conjugados de falotoxina se evaluó utilizando el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para ello, fibroblastos de ratones MF/LDB, NIH/3T3 o Hela conservados en medio esencial mínimo modificado de Dulbecco con un 10% de suero fetal bovino, y células Jurkat conservadas en medio RPMI 1640 con un 10% de suero fetal bovino y 0,05 mM de β -mercaptoetanol, se cultivaron a 37°C en un incubador humidificado con un 95% de aire y un 5% de CO₂. Las células en crecimiento exponencial se sembraron con una densidad de 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos 24 horas antes de que se añadiera la toxina, utilizando un volumen igual al volumen del medio existente en la placa de cultivo. La concentración final de toxinas en los medios estaba comprendida entre 10^{-3} M y 10^{-9} M. A las 72 horas, el medio fue sustituido por medio sin suero que contenía 25 μ l de solución MTT (5 mg/ml en PBS), y la incubación continuó a 37°C durante 4 horas. A continuación, se añadió el tampón de lisis (100 μ l de SDS al 20% en dimetilformamida al 50%) en cada pocillo, y se incubó durante otras 16-20 horas. La viabilidad de las células se determinó midiendo la absorbancia a 570 nm en cada pocillo con un lector de microplaca (Molecular Devices). Los valores de Cl_{50} se calcularon como la concentración de toxina necesaria para reducir la absorbancia un 50% en los cultivos de control.

40 Tanto en las células Jurkat como Hela, los conjugados macromoleculares de aminofaloidina resultaron notablemente más tóxicos para las células tumorales (>1.000) que la faloidina natural. Los datos están representados en la figura 5. Para esta actividad citotóxica, es de gran importancia la presencia de un grupo disulfuro en la región del conector entre la toxina y la macromolécula. Tras la captación hacia el interior de las células tumorales, el grupo disulfuro se separa por reducción liberando tiopropionil-aminofaloidina o tiopropionil-aminofalacidina en el citoplasma. Se demostró que la tiopropionil-aminofaloidina se une a la actina tan fuertemente como la propia faloidina, sugiriendo que su actividad citotóxica dentro de la célula es similar a la de la faloidina.

50 El posible beneficio de la presente invención es poner a disposición del uso terapéutico agentes como las amatoxinas, excluidos hasta el momento del uso terapéutico pero que impresionan por su capacidad para inducir la apoptosis en las células tumorales o las células nocivas del sistema linfático cuando se conjugan con los portadores macromoleculares adecuados. Tanto el tratamiento de los tumores sólidos como de las enfermedades inflamatorias mediante dichos conjugados moleculares, aprovechan que los procesos inflamatorios, al igual que los tumores sólidos, provocan un derrame en el sistema de capilares (fenestración, potenciación de la permeabilidad y retención, efecto EPR). Este efecto permite que las macromoléculas (por ejemplo, proteínas) penetren en el tejido colindante, aumentando así la concentración de macromoléculas del suero en el entorno de los tumores y en los lugares con inflamación. Esto podría explicar la citotoxicidad específica observada en casos en los que no se encuentran disponibles receptores específicos para un conjugado. Además, los tumores sólidos sufren un escaso aporte de aminoácidos y glucosa, por lo que interiorizan las proteínas séricas (por ejemplo, albúmina) en concentraciones muy superiores a las de las células normales para satisfacer sus requisitos de metabolitos y energía. Ambos efectos son importantes para la aplicación satisfactoria de los conjugados de toxinas descritos para el tratamiento de tumores y de enfermedades inflamatorias.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de la fórmula general portador-toxina, en el que
- 5 - la toxina es una amatoxina; y
- el portador comprende un anticuerpo monoclonal específico de tumor que se une a o es absorbido por las células tumorales;
- 10 en el que el conjugado puede obtenerse haciendo reaccionar el anticuerpo monoclonal específico de tumor con 10 a 30 equivalentes de éster de β -amanitina-N-hidroxisuccinimida durante 16 horas a 4°C.
2. Conjugado según la reivindicación 1, en el que el portador presenta una masa molar de 20 a 300 kDa.
- 15 3. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la proporción molar de toxina:portador se encuentra entre 1:1 y 15:1.
4. Composición que comprende el conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en combinación con compuestos anticancerosos adicionales.
- 20 5. Composición según la reivindicación 4, en la que los compuestos anticancerosos adicionales son seleccionados de entre el grupo constituido por análogos de nucleósidos, taxol y tecanos.
6. Composición farmacéutica que comprende:
- 25 (a) el conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; o
(b) la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 7. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para su utilización terapéutica.
8. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para su utilización en el tratamiento del cáncer.
- 35 9. Utilización del conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.
- 40 10. Utilización del conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en ensayos de biología celular para indicar la interiorización del conjugado, que comprende las etapas que consisten en:
- incubar *in vitro* dicho conjugado en presencia de células diana; y
- determinar la aparición de episodios tóxicos en la célula.
- 45 11. Utilización según la reivindicación 10, en el que el episodio tóxico es la apoptosis.

Figura 1

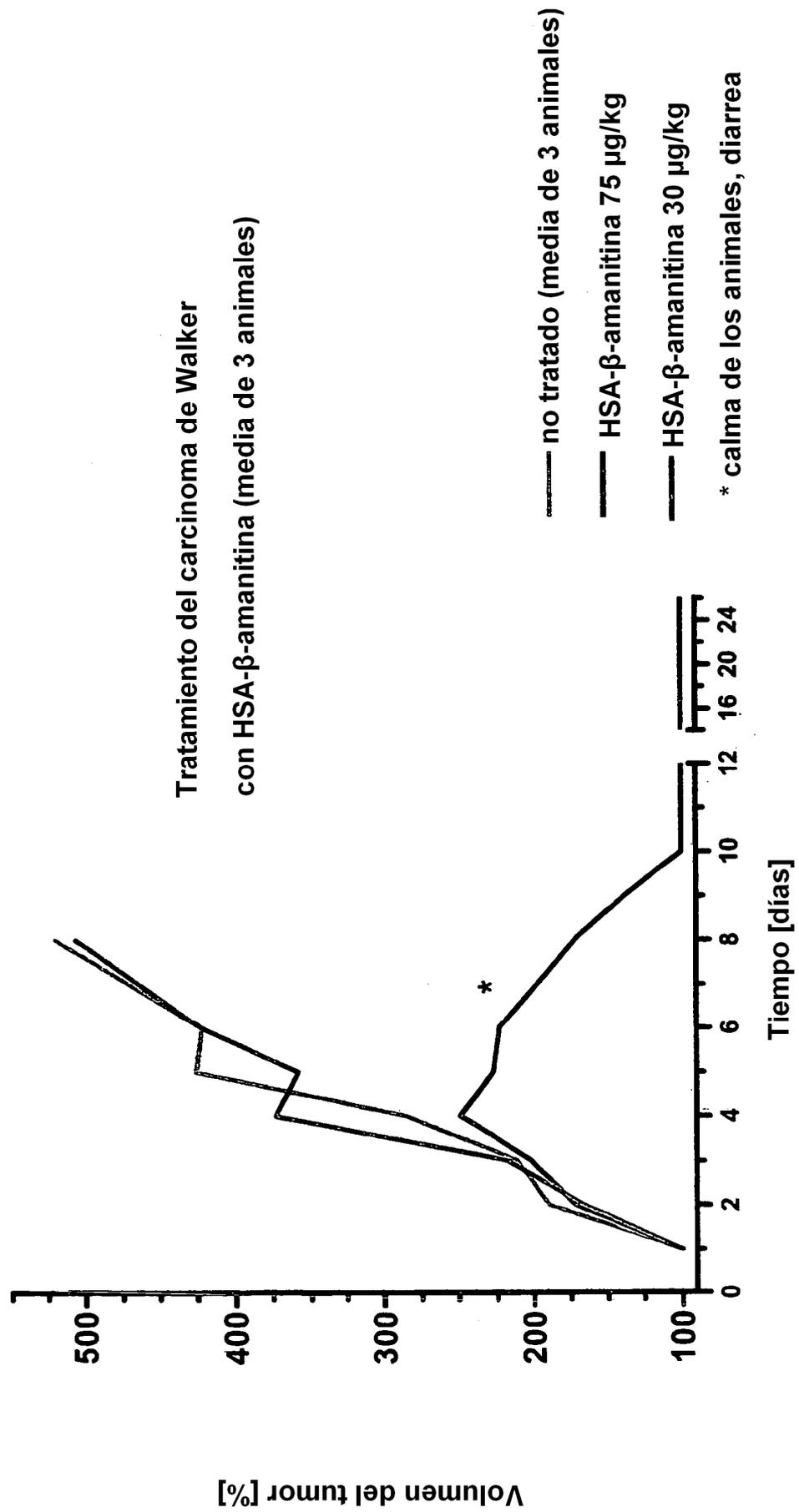


Figura 2

Citotoxicidad de las inmunotoxinas de amanitina
Inhibición de la incorporación de [3H]-timidina en células MCF-7 de cáncer de mama

El conjugado HEA 125-Ama específico del EpCAM es 2.700 veces más tóxico para las células que el conjugado de anticuerpos monoclonales ALH419 inespecíficos

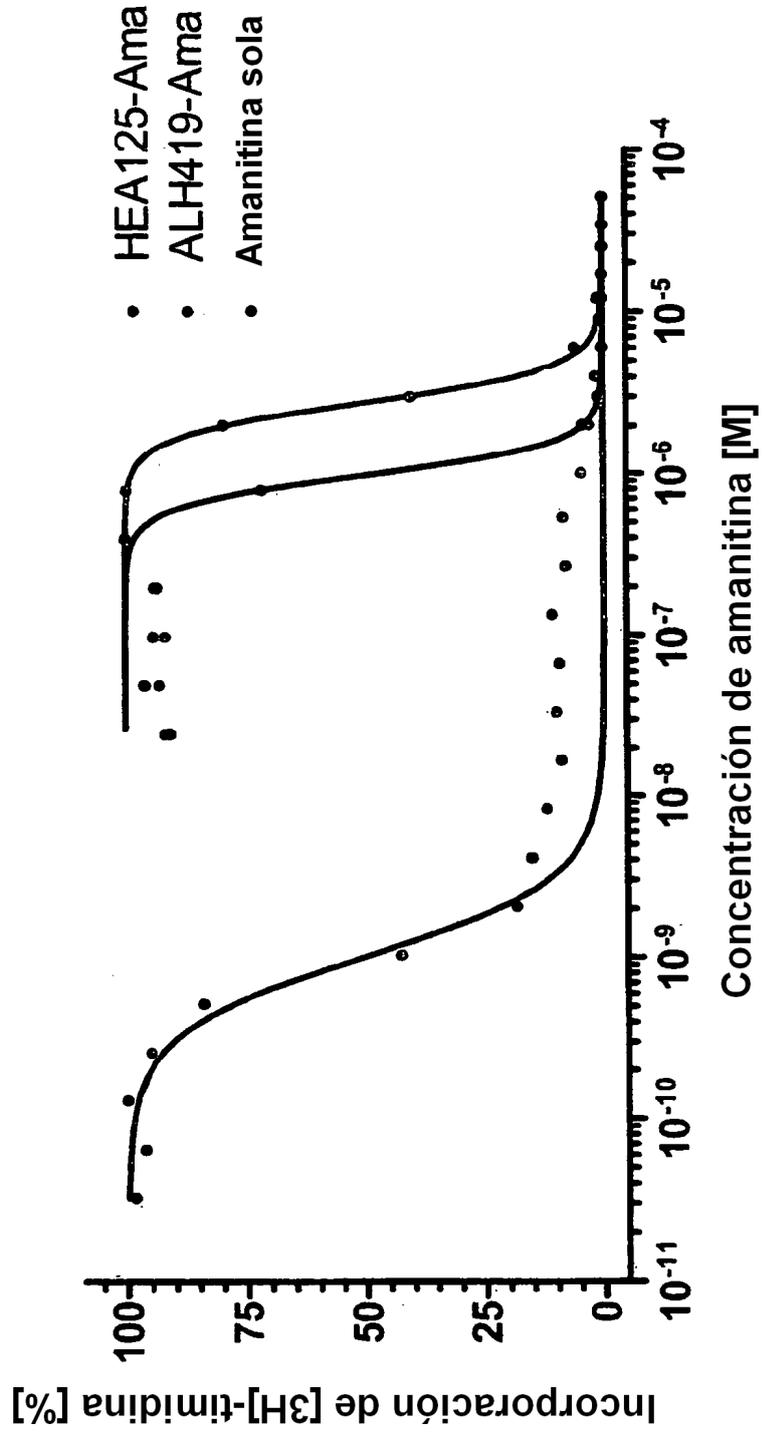


Figura 3

Citotoxicidad de las inmunotoxinas de amanitina
Inhibición de la incorporación de [3H]-timidina en células Jurkat de linfoma T

El conjugado OKT3-Ama específico de CD3 es 330 veces más tóxico para las células que el conjugado de anticuerpos monoclonales ALH419 inespecíficos

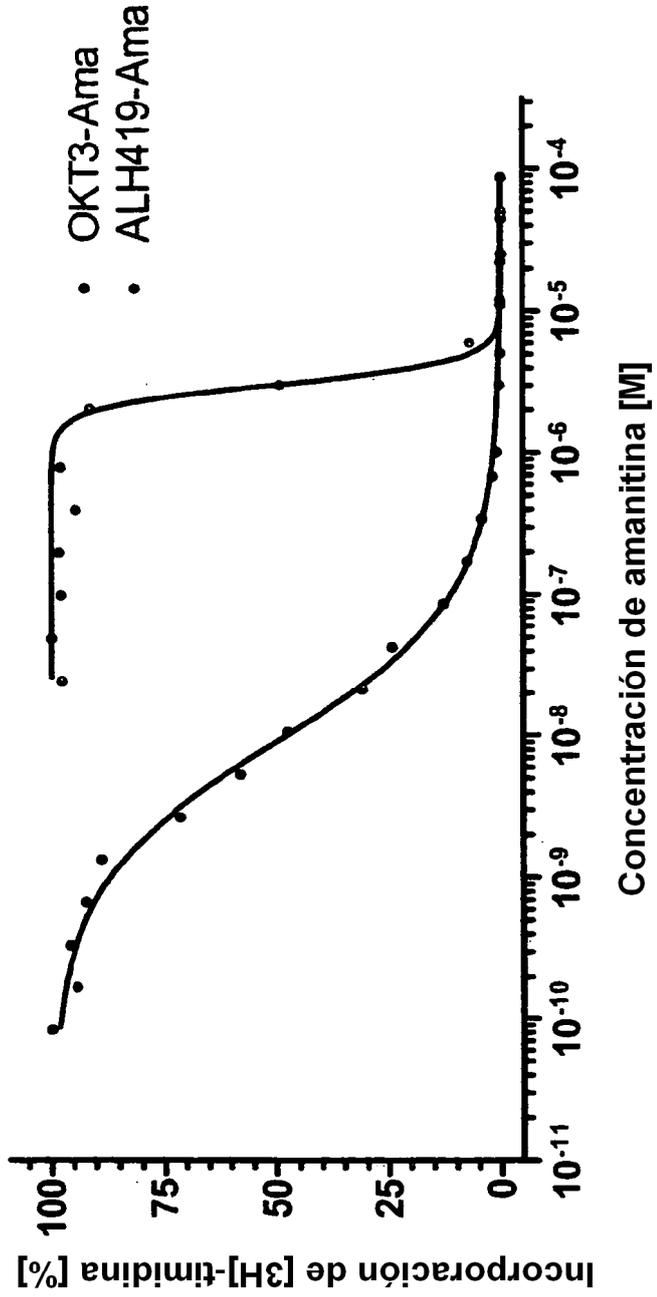


Figura 4

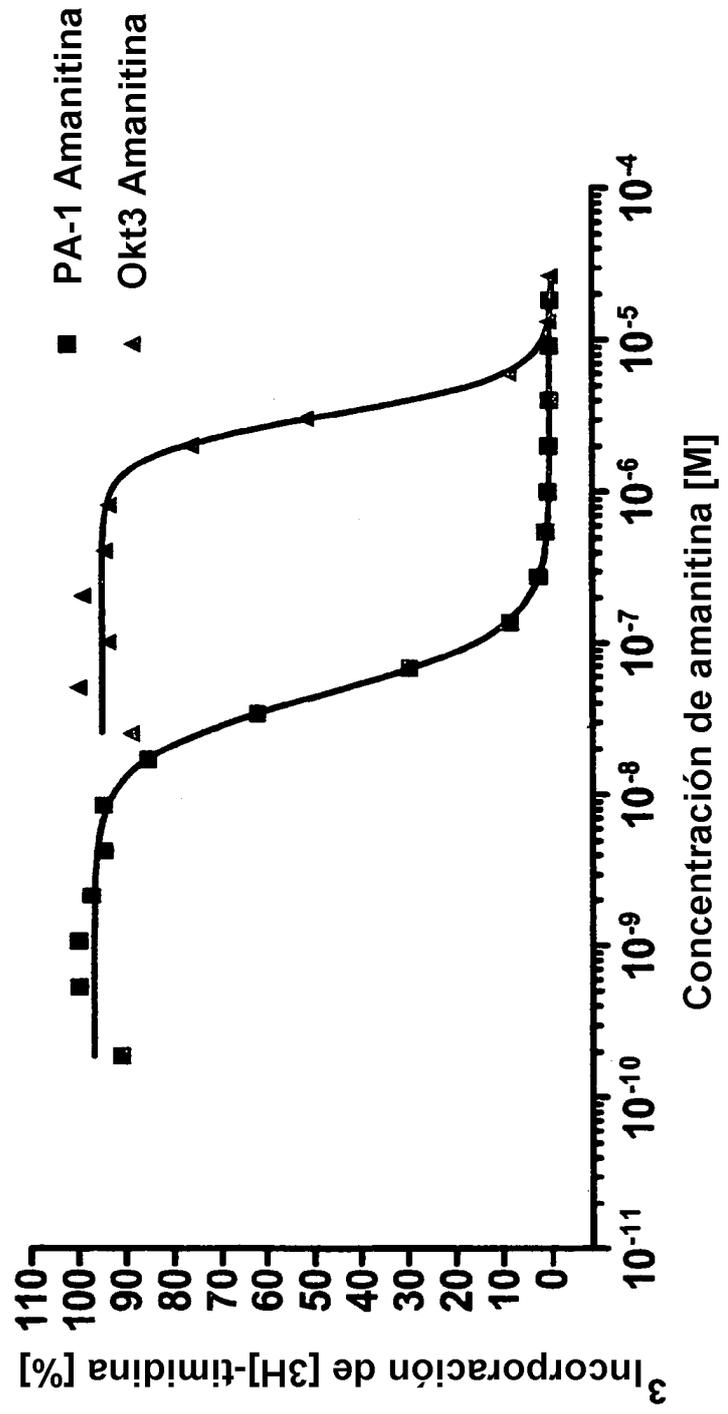


Figura 5
Inhibición del crecimiento de células tumorales (Jurkat, Hela) mediante un conjunto de polilisina-aminofaloidina, pero no con faloidina sola

