

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 437**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06728287 .1**  
96 Fecha de presentación: **20.04.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1874352**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **TERAPIA FOTODINÁMICA QUE UTILIZA QUIMIOLUMINISCENCIA Y UN CONJUGADO LIGANDO-FOTOSENSIBILIZANTE.**

30 Prioridad:  
**21.04.2005 IL 16818405**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2012**

73 Titular/es:  
**Ariel-University Research and Development  
Company Ltd.  
Kiryat HaMada  
40700 Ariel, IL**

72 Inventor/es:  
**FIRER, Michael A. y  
LAPTEV, Raisa**

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

**ES 2 374 437 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

Terapia fotodinámica que utiliza quimioluminiscencia y un conjugado ligando-fotosensibilizante

5 **Campo de la invención**

La presente invención hace referencia a un método para destruir de forma selectiva células diana mediante un tratamiento combinado que utiliza un conjugado ligando-toxina y un agente quimioluminiscente, donde el conjugado comprende un fotosensibilizante, como la hematoporfirina.

10

**Estado de la técnica**

La baja especificidad dirigida de los agentes quimioterapéuticos ha estimulado el desarrollo de estrategias de transporte dirigido de fármacos como los conjugados ligando-toxina (CLT), que implican el acoplamiento de una molécula efectora con un ligando transportador que está dirigido a un receptor específico de la célula diana [véase, p. ej., Mrsny R.J.: Expert Opinion on Biological Therapy 4 (2004) 65-73]. Los ligandos como las pequeñas moléculas tienen ventajas sobre otras moléculas mayores como los anticuerpos. Los presentes inventores han informado recientemente del uso de CLTs que contienen pequeñas moléculas para la destrucción dirigida de células plasmáticas [Fierer M.A. et al.: Leukemia and Lymphoma 44 (2003) 681-9], sugiriendo que este enfoque puede ser aplicable para el tratamiento del mieloma múltiple. La estrategia CLT representa uno de los aspectos de la presente invención. Otro aspecto implica la Terapia Fotodinámica (TFD), un procedimiento de dos fases basado en dos componentes no tóxicos que se combinan para inducir alteraciones en la membrana que conducen a la citólisis. El primer componente es una molécula fotosensibilizante (Fs), generalmente un derivado de la porfirina, que transfiere la energía al oxígeno molecular cuando se activa mediante luz, produciendo especies reactivas de oxígeno que causan un daño directo a los componentes celulares, concretamente a los fosfolípidos de membrana. Se cree que la TFD actúa en la destrucción de las células tumorales mediante, al menos, dos mecanismos adicionales: destrucción de las células tumorales vasculares, y la inducción de las reacciones antitumorales inflamatoria e inmune. Tanto la historia, como el mecanismo de acción y las aplicaciones biomédicas de la TFD han sido objeto de varias revisiones [véase, p. ej., Sharman W.M. et al.: Adv. Drug Delivery Rev. 56 (2004) 53-76]. Existen dos grandes problemas que limitan el amplio uso de la TFD como una modalidad de tratamiento. En primer lugar, dado que los fotosensibilizantes tienden a acumularse en el tejido tumoral, su uso clínico puede verse descartado debido a los efectos secundarios tóxicos. Para superar este problema, se une el Fs de forma covalente a moléculas transportadoras para que se localice el efecto de la TFD en una célula diana [P. ej., Brown S.B. et al.: (2004). Lancet Oncol. 5 (2004) 497-508]. Un sistema de transportador proteína-receptor atractivo para este propósito utiliza la interacción de alta afinidad entre la transferrina (Tf) transportadora de hierro y su receptor de superficie celular (RTf, CD71). Como todas las células en división necesitan un suministro continuo de hierro para su metabolismo, no es sorprendente que el RTf esté sobre-expresado en una gran variedad de células malignas [Ponka P. et al.: Sem. Hematol. 35 (1998) 35-54], por lo que se ha utilizado el sistema Tf-RTf en varios formatos para dirigir compuestos Fs a diferentes tipos de células malignas [Hamblin M.R. et al.: J. Photochem. Photobiol. 26 (1994) 45-56; Rittenhouse-Diakun K. et al.: Treat. Vol. 72, N°2, March 2002, pages 117-130, xP00242 1374; Gijsens A. et al.: Int. J. Cancer. 101 (2002) 78-85; Li H. et al.: Med. Res. Rev. 22 (2002) 225-50]. El segundo gran problema en relación a la TFD es la limitada penetración en el tejido de la luz externa. A pesar de los avances en el desarrollo de dispositivos de luz externa para fototerapia, y del exitoso uso clínico de la TFD en cánceres periféricos y en dermatología, el tratamiento de tejidos internos permanece limitado a procedimientos invasivos, como el uso de catéteres. Ha habido intentos de desarrollar enfoques moleculares para la activación del Fs. Carpenter [Carpenter S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 91, December 1994 (1994-12), pages 12273-12277, XP001187053 ISSN: 0027-8424] empleó la activación bioluminiscente intracelular de la hipericina y la posterior destrucción de las células dermales equinas, mientras que Phillip [Phillip M.J. et al.: Oncology 46 (1989) 266-72] utilizó un derivado de la hematoporfirina (Fotofrina II) y una solución multi-componente para inducir la QL intracelular en adenocarcinomas de mama. Sin embargo, los sistemas existentes no proporcionan suficiente especificidad ni eficiencia en la TFD. Por lo tanto, uno de los objetivos de esta invención es proporcionar un bioconjugado con parámetros significativamente mejores.

Se ha utilizado exitosamente el luminol (5-amino-2-3-dihidro-1,4-ftalazinediona) en varios análisis de sistemas basados en QL [Kricka J.L.: Ann. Clin. Biochem. 39 (2002) 114-29; Templin M.F. et al.: Drug. Discov. Today 7 (2002) 815-22]. El mecanismo de la reacción QL del luminol se conoce desde hace tiempo, y aunque se han examinado algunos aspectos físico-químicos de la activación del luminol en macrófagos [Nemeth A. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 255 (1999) 360-6], nunca se ha explotado la relación luminol-TFD para inducir citotoxicidad por TFD en células tumorales. Por lo tanto, otro objetivo de la presente invención es proporcionar una TFD que comprende un CLT y un agente quimioluminiscente.

Theodossiou Theodossis et al relaciona la luciferina de luciérnaga activada por rosa de bengala y la terapia fotodinámica *in vitro* mediante quimioluminiscencia intracelular en células NIH 3T3 transgénicas; Cancer Research, vol. 63, no. 8, April 15, 2003 (2003-04-15), pages 1818-1821, XP002421372 ISSN 0008-5472.

65 Otros objetivos y ventajas de la presente invención aparecerán según avanza la descripción.

**Resumen de la invención**

La invención proporciona un método para destruir células diana seleccionadas que comprende los pasos de i) exponer dichas células a un agente activador quimioluminiscente (AQ), y ii) unir a dichas células un conjugado ligando-toxina (CLT) que comprende un fotosensibilizante (Fs) y un ligando conjugado a éste. Dicho AQ produce luz quimioluminiscente, que activa a dicho Fs, el cual, transfiere energía al oxígeno molecular y produce especies reactivas de oxígeno, causando daño a dichas células diana. Estos AQ producen luz reaccionando con las especies de oxígeno presentes *in situ*. En el método de la invención, los pasos i) y ii) pueden llevarse a cabo en cualquier orden o de forma simultánea. Además, el AQ y el CLT pueden unirse de varias maneras. Dicho CLT comprende un ligando que es una pequeña molécula, péptido o proteína, u otro factor que tenga afinidad con un componente de la superficie de la célula diana, como la transferrina, el cual se pretende unir a un receptor celular específico como el receptor de la transferrina en dichas células diana. Este CLT comprende, preferiblemente, hematoporfirina como Fs. En un aspecto preferido de la invención, el CLT en un método para destruir células diana comprende transferrina y hematoporfirina. Las células que van a ser destruidas están relacionadas preferiblemente con una enfermedad proliferativa. Dichas células pueden formar parte de la sangre, la piel, tejidos internos, o de forma alternativa, de un cultivo celular. La invención proporciona un método para destruir células cancerígenas.

También esta descrito en la invención el tratamiento de un sujeto con una enfermedad asociada a una proliferación o actividad celular no deseada, que comprende la administración a dicho sujeto de dos componentes: un CLT que comprende un Fs, y un AQ. La administración de este CLT y de este AQ puede llevarse a cabo en cualquier orden o de forma simultánea. También pueden asociarse el CLT y el AQ juntos. Dicho CLT comprende preferiblemente transferrina. Dicho Fs comprende preferiblemente hematoporfirina. En un aspecto preferido, se asocian en dicho CLT la transferrina y la hematoporfirina. Dicha enfermedad puede ser una enfermedad cancerígena o una hiperplasia. Esta enfermedad puede incluir desórdenes en los que la proliferación celular contribuye a la patogénesis, incluyendo aterosclerosis, artritis reumatoide, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, escleroderma, cirrosis, endometriosis, neovascularización y tumores.

La invención también hace referencia al uso combinado de un CLT que comprende un Fs, y un AQ para el tratamiento del cáncer, donde dicho CLT comprende preferiblemente transferrina y hematoporfirina. Dicho AQ puede emparejarse con dicho CLT, por ejemplo, mediante un enlace covalente.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado ligando-toxina para ser usado en el tratamiento de enfermedades proliferativas, donde dicho ligando es transferrina, dicho tóxico es un fotosensibilizante, y donde dicho fotosensibilizante se activa *in situ* mediante un agente quimioluminiscente. La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente quimioluminiscente para ser usado en el tratamiento de enfermedades proliferativas, donde dicho agente activa *in situ* a un conjugado ligando-toxina.

También se describe un método para destruir las células perjudiciales que comprende los pasos de i) unir a dichas células un conjugado ligando-toxina (CLT) que comprende un fotosensibilizante (Fs); y ii) exponer dichas células a un agente quimioluminiscente (AQ); de ese modo, se activaría dicho fotosensibilizante, creando especies reactivas de oxígeno, e induciendo la citólisis de dichas células perjudiciales.

**Breve Descripción de las Figuras**

Estas y otras características, así como las ventajas de la invención se harán más patentes a través de los siguientes ejemplos, y en referencia a las figuras anexas, donde:

Fig. 1. muestra el espectro de absorbancia en luz visible-UV de Tf, Hp, y Tf-Hp en PBS;

Fig. 2. demuestra la citotoxicidad dependiente de dosis de Hp y Tf-Hp para células FL (A), K562 (B), y U-76. (C); se cultivaron  $0.5-1 \times 10^5$  células/ml durante 2 horas en oscuridad en medio solo o conteniendo Hp o Tf-Hp (0-3  $\mu\text{M}$ ), se lavaron, se expusieron a luz ambiente fluorescente durante 16 horas a temperatura ambiente y, después, se recultivaron en medio completo durante 24 horas. Se analizó la viabilidad celular mediante exclusión del azul de tripano. Los datos representan la media y la desviación estándar de, al menos, 3 experimentos;

Fig. 3. es la Tabla 1, que muestra la comparación de la eficiencia citotóxica de la TFD inducida por Tf-Hp o Hp para tres líneas celulares;

Fig. 4. muestra la activación molecular intracelular del efecto de la TFD. Las células FL se cultivaron en oscuridad durante 48 horas a 37°C con hematoporfirina (Hp) o conjugado hematoporfirina-transferrina (Tf-Hp) (0-3  $\mu\text{M}$ ) junto con 10  $\mu\text{M}$  de luminol. No se llevó a cabo ninguna otra manipulación o radiación externa de las células. Al final del periodo de cultivo, se determinó la viabilidad celular mediante exclusión del azul de tripano;

Fig. 5. es un gráfico que muestra el efecto de dos componentes de la activación intracelular, en la TFD. Las células FL se cultivaron en oscuridad durante 48 horas a 37°C con combinaciones a diferentes concentraciones de conjugado hematoporfirina-transferrina (Tf-Hp) (0-3  $\mu$ M) y luminol.

- 5 Fig. 6. (0-10  $\mu$ M). No se llevó a cabo ninguna otra manipulación o radiación externa de las células. Al final del periodo de cultivo, se determinó la viabilidad celular mediante exclusión del azul de tripano; y se muestra el efecto de los dos componentes, el CLT y un agente quimioluminiscente, sobre la citotoxicidad celular, respecto al retraso en su aplicación, y al orden de aplicación. La Fig. 6A muestra el efecto de la activación retrasada de la TFD por el luminol sobre la citotoxicidad de las células FL tratadas con Tf-Hp. Las células se cultivaron durante 2 horas en oscuridad a 37°C con Tf-Hp (0-3  $\mu$ M) y se lavaron. Tras varios tiempos de retardo (0, 30, 60 ó 90 minutos), se añadió luminol (5  $\mu$ M) y las células se cultivaron durante 16 horas más en oscuridad. La figura muestra el % de citotoxicidad inducida. El punto de retraso 0 incluye el tiempo para el lavado de las células y su devolución al medio de cultivo (aproximadamente, 15 min.). La Fig. 6B muestra el efecto del pretratamiento de las células FL con luminol sobre la inhibición del crecimiento celular por Tf-Hp. Las células se cultivaron primero durante 24 horas en presencia de 10  $\mu$ M de luminol en oscuridad durante 24 horas, se lavaron o no se lavaron, y después se cultivaron durante 24 horas más en presencia de Tf-Hp (0-3  $\mu$ M) a 37°C.

### **Descripción Detallada de la Invención**

- 20 Ya se ha demostrado que los bioconjugados que comprenden hematoporfirina (Hp) y la proteína transportadora transferrina (Tf) mejoran significativamente la especificidad y eficiencia de la TFD en células eritroleucémicas, cuando se aplica con luminol. El efecto tóxico sinérgico observado no depende del orden en el que las células se ponen en contacto con el agente quimioluminiscente y con el conjugado ligando-fotosensibilizante.
- 25 Es sabido que los agentes quimioluminiscentes (QL) como el luminol o el isoluminol o la lucigenina, emiten luz cuando se oxidan. Sin desear limitarnos a la teoría, parece que el luminol, en un método según la invención, es inducido a emitir luz tras la activación *in situ* mediante la existencia de factores oxidantes que incluyen oxígeno molecular, o grupos químicos y moléculas capaces de proporcionar átomos de oxígeno o peróxidos u otras especies reactivas de oxígeno (ERO). Dichos factores oxidantes, como el oxígeno o las ERO, inducirán la emisión de luz, poniendo en movimiento una cascada de eventos que incluyen la formación de más ERO, activando el componente Fs del conjugado ligando-toxina, y finalizando con la destrucción celular. Esta fuente de ERO y oxígeno, bien producida metabólicamente o bien proporcionada por un suministro externo de oxígeno, prolonga el ciclo de la TFD. Para matar a las células diana es suficiente una concentración sorprendentemente baja de agente QL, que no se espera que sea tóxica por sí misma. Además, dado que no es necesario que los componentes de la invención para la TFD estén presentes de forma simultánea, se obvia otro problema del estado de la técnica de la TFD, es decir, el requerimiento de la presencia coordinada de varios factores en la célula.

- 35 Se separó el conjugado preferido de la invención, el conjugado Tf-Hp, en Tf y Hp mediante HPLC y se caracterizó mediante espectrofotometría UV-Vis (Figura 1). El espectro de Tf revela un máximo típico en  $\lambda = 280$  nm, mientras que el máximo de absorción de Hp está en  $\lambda = 375$  nm. El conjugado Hp-Tf tiene dos picos de absorción en  $\lambda = 280$  nm y 412 nm y el espectro se caracteriza por una desviación hacia el rojo del máximo, que no es una simple superposición de los espectros de sus componentes.

- 45 La Figura 2 muestra el efecto de respuesta a la dosis del tratamiento con CLT Hp o Tf-Hp sobre la viabilidad de las células FL, K562 y U-76. La incubación de las células con varias concentraciones de Hp o Tf-Hp en oscuridad seguida de la exposición durante toda la noche a luz ambiente fluorescente, mostró que, para todos los tipos celulares, Tf-Hp fue mucho más citotóxico que Hp solo. La Figura 3 (Tabla 1) muestra que la concentración requerida de Tf-Hp para lograr la  $DL_{50}$  fue más de 6 veces menor que con Hp. Además, los valores de  $DL_{100}$  sólo se obtuvieron con el Tf-Hp. Las células de hibridoma U-76 fueron relativamente insensibles a la TFD. La concentración de Tf-Hp requerida para alcanzar la  $DL_{90}$  en estas células fue >19.4 veces mayor que para las células FL y >3.5 veces mayor que para las células K-562. Este orden de sensibilidad se mantuvo a las concentraciones requeridas para la  $DL_{MÁX}$  (3.37 para FL y 0.8 para K562). Además, sólo se obtuvo un 100% de citotoxicidad cuando el conjugado se utilizó contra líneas celulares eritroleucémicas. Se observó también un patrón similar de sensibilidad con el tratamiento con Hp libre. Aunque se alcanzó una  $DL_{MÁX}$  similar (90%) en ambas líneas eritroleucémicas, las células FL fueron 16.6 veces más sensibles que las K-562.

- 55 Se obtuvo más evidencia de la mayor citotoxicidad de Tf-Hp respecto a la Hp libre con la microscopía de fluorescencia, la cual puso de manifiesto la presencia y localización del Fs en las células FL tras 45 y 60 minutos de incubación, bien con Hp o bien con Tf-Hp. En ambos puntos temporales, se observó una fluorescencia de Hp relativamente débil (ya que no se usó ninguna solución blanqueante), limitada principalmente a la región de la membrana plasmática. Se hizo evidente una fluorescencia significativamente mayor en las células tratadas con Tf-Hp. Tras 45 minutos, el conjugado estaba localizado en los parches de membrana (posiblemente delimitando los compartimentos endolisosomales) y a los 60 minutos, había infiltrado la mayoría del citoplasma.

- 65 Además, se evaluó la habilidad de inducir TFD por parte de una señal de luz intracelular quimioluminiscente. La Figura 4 muestra la citotoxicidad inducida en las células FL cultivadas en oscuridad con Hp o Tf-Hp bien solas o

junto con 10  $\mu\text{M}$  de luminol. Las células no se expusieron a luz ambiente fluorescente en ninguna etapa del procedimiento. Se encontró que i) el luminol solo indujo aproximadamente un 15% de citotoxicidad, ii) la Hp sola tuvo poco efecto sobre la viabilidad celular, iii) la citotoxicidad alcanzó un máximo del 30% en presencia de Hp y luminol y iv) el luminol indujo un efecto en la TFD significativo (95%) sobre la adición de Tf-Hp. La Figura 5 demuestra además que el efecto sobre la TFD de la citotoxicidad inducida por luminol es dependiente de la concentración de Tf-Hp y de luminol, produciendo un máximo de citotoxicidad la combinación de 10  $\mu\text{M}$  de luminol y 3  $\mu\text{M}$  de conjugado. Una reducción en la concentración de Tf-Hp tuvo menos efecto sobre la citotoxicidad que la reducción de los niveles de luminol. Se comprobó si la sincronía en la exposición a luminol y a Tf-Hp es un requerimiento para esta citotoxicidad, incubando primero las células con Tf-Hp, lavándolas y exponiéndolas después a luminol seguido de varios tiempos de retardo. Se tardó aproximadamente 15 minutos en lavar las células y devolverlas al medio de cultivo. Aunque el retraso en la exposición al luminol de 30 minutos no tuvo ningún efecto en la citotoxicidad (Figura 6A), tras 60 minutos de retardo, el efecto de la TFD se redujo en un 50%. Sin embargo, si se invertía el protocolo (Figura 6B), se encontró que la pre-incubación con luminol durante 24 horas sensibilizaba a las células a la exposición retrasada a Tf-Hp y que el efecto de la TFD era dependiente de dosis.

Esta invención hace frente a dos problemas de la tecnología de la TFD. El primer problema se refiere al desarrollo de sistemas de TFD para mejorar la eficiencia del transporte del Fs a las células diana. La mayoría de los estudios de TFD dirigida han usado anticuerpos monoclonales como fracción dirigida. Dado que el uso de los anticuerpos presenta varias limitaciones prácticas, un enfoque alternativo podría dirigir un conjugado de Tf-Hp a los receptores de la Tf. Ya se ha examinado el potencial terapéutico de los conjugados toxina proteica-Tf [Weaver M. et al.: J Neurooncol. 65 (2003) 3-13], química-Tf [Singh M. et al.: Anticancer Res. 18 (1998) 1423-7], pero se conoce menos de los conjugados Tf-Hp, concretamente respecto a la Hp que, aunque se ha venido utilizando clínicamente con éxito en su forma libre durante una década [Dolmans D.E. et al.: Nature Reviews Cancer 3 (2003) 380-7], se ha evaluado poco en la TFD dirigida [Hamblin M.R. et al.: J. Photochem. Photobiol. 26 (1994) 45-56]. La presente invención proporciona conjugados Tf-Hp que son, al menos, 6 veces más efectivos en la inducción de la muerte celular, incluso a nivel de  $\text{DL}_{50}$  (Figura 2 y Tabla 1).

Cuando se utiliza Tf-Hp, además de incrementar la especificidad dirigida y la eficiencia, la muerte celular inducida por la TFD es más rápida. Por ejemplo, durante la optimización del ensayo de citotoxicidad con CLT, encontramos que mientras se alcanzaba casi un 100% de citotoxicidad tras sólo 30 minutos de exposición a Tf-Hp, se requerían unas 2 horas para la actividad máxima (24%) de Hp libre. Además, la microscopía de fluorescencia de las células FL tratadas con Hp y Tf-Hp demostró que Tf-Hp se absorbe más rápidamente y que alcanza los orgánulos intracelulares, dando lugar a una alteración más efectiva de las membranas intracelulares.

La invención trata también el segundo problema de la tecnología de la TFD, referido a la fuente de la señal activadora luminiscente enviada al Fs. Una radiación externa proporciona una excitación homogénea del Fs en el cultivo de tejido o durante la inyección subcutánea, sin embargo, la penetración de luz visible en el interior del tejido se limita a unos pocos milímetros, descartando el uso de la TFD en dianas en tejidos más profundos. Los esfuerzos para superar esta limitación se han concentrado en nuevos dispositivos de luz externa o en catéteres mejorados. El objetivo de la invención era proporcionar un mecanismo emisor de luz molecular dentro de la célula diana cargada con el Fs. Esta estrategia no es invasiva, no expone el tejido normal a la irradiación y puede transportarse a este iluminador molecular a las células diana *in vivo*. Usamos el término *Activación Intracelular de la TFD (AIT)* para describir a este tipo de sistemas moleculares.

El luminol es un activador quimioluminiscente que experimenta un proceso emisor de luz catalizado por iones metálicos y peróxido de hidrógeno. Este proceso se emplea en técnicas de detección quimioluminiscente y en estudios de fisiología celular, pero la invención saca partido del luminol como fuente de energía en el campo de la TFD para las células cancerígenas. El espectro de emisión del luminol comprende dos picos principales, a 424 y 485 nm. Observamos que el primer pico corresponde a una cresta en el espectro de absorción de Tf-Hp (412 nm, Figura 1), sugiriendo, junto con la absorción intracelular mejorada de Tf-Hp respecto a Hp, que la AIT con luminol es efectiva. Inicialmente, se mezcló Hp o Tf-Hp con luminol y se añadió a un cultivo de células FL en oscuridad (Figura 4), Tf-Hp a altas concentraciones, por sí solo, indujo bajos niveles de citotoxicidad en concordancia con estudios previos [Supino R. et al.: Chem. Biol. Interact. 57 (1986) 258-94; Luksiene Z. et al.: Medicina 39 (2003) 677-82], efecto que puede estar relacionado con la capacidad de Hp de inhibir la actividad de la proteína quinasa C. Cuando se añadió Tf-Hp junto con luminol a las células, no sólo hubo un efecto de TFD significativo, sino que la eficiencia citotóxica de Tf-Hp sobre Hp fue incluso mayor que la observada con la fuente de luz externa (Figura 2). Sin embargo, la concentración de Tf-Hp requerida para alcanzar la  $\text{DL}_{\text{MAX}}$  en el sistema de AIT fue 6.7 veces mayor que con radiación externa (Figura 4 y Tabla 1). En un estudio previo, Carpenter [Carpenter S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol, 91, Diciembre de 1994, páginas: 12273-12277, XP001187053 ISSN: 0027-8424] describió un sistema de AIT bioluminiscente para TFD que inducía la muerte de las células infectadas por un virus, implicando la activación de la hipericina seguida de la oxidación de la luciferina por la luciferasa.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales para analizar si es necesario aplicar simultáneamente el Fs y el sistema AIT para producir una respuesta efectiva con la TFD (Figura 6). Retrasar 45 minutos la adición de luminol a las células cargadas con Tf-Hp no redujo la citotoxicidad y, dado que las células se lavaron minuciosamente antes de la exposición al luminol, estos resultados reflejan la activación intracelular de Tf-Hp más que del material

pobremente unido a la membrana. Retrasar 30 minutos más la exposición al luminol redujo el efecto de la TFD a la mitad, sugiriendo que el tiempo de residencia de Tf-Hp es un factor limitante en este sistema. Cuando los componentes se añadieron en el orden inverso, las células cargadas de luminol permanecieron muy sensibles a la TFD incluso cuando la adición de Tf-Hp se retrasó durante 24 horas.

5 Como se ha mencionado, la Terapia Fotodinámica (TFD) implica un proceso de dos etapas. En el primer paso, se produce la endocitosis de un fotosensibilizante (Fs) que absorbe luz (por ejemplo, la hematoporfirina, Hp). En el segundo paso, se activa al Fs con luz, transfiriendo energía a una molécula aceptora citoplásmica que activa el oxígeno molecular, produciendo especies reactivas de oxígeno (ERO) que dañan los componentes celulares, en concreto, las membranas fosfolípicas. Como resultado de este proceso se conduce a la citólisis. Los esfuerzos para expandir el uso de la TFD en la práctica clínica se han visto dificultados por la falta de especificidad del Fs por las células diana y por la escasa penetración tisular de la radiación de luz externa. La invención proporciona bioconjugados que comprenden la proteína transportadora transferrina y Hp (Tf-Hp), que mejoran significativamente la especificidad y eficiencia de la TFD en las células eritroleucémicas en, al menos, 20 veces al nivel de la DL<sub>50</sub>. La microscopía de fluorescencia mostró que los conjugados son endocitados y acumulados en las vesículas intracelulares mientras que la Hp libre se unió en su mayoría a la membrana. Además, los inventores demostraron que puede eludirse el uso de radiación externa para la activación del Fs mediante la incubación de las células con luminol, bien de forma previa o bien junto al Tf-Hp. El luminol se activa de forma intracelular para producir radiación quimioluminiscente que estimula la citotoxicidad inducida por la TFD en el 95% de las células. Estas estrategias proporcionan aplicaciones de la TFD más seguras y efectivas.

La presente invención proporciona un nuevo enfoque para superar las limitaciones de las aplicaciones de la TFD. Se estableció primero la eficacia de la estrategia dirigida del CLT utilizando el sistema Tf-Hp, y luego se demostró la aplicabilidad del luminol *in vitro*, donde el luminol puede utilizarse como un poderoso inductor molecular de QL intracelular para la destrucción de las células leucémicas, obviando el uso de fuentes de luz externas en la TFD.

En conclusión, la invención proporciona conjugados Tf-Hp como un vehículo viable para la citotoxicidad inducida en la TFD. La mejora de la especificidad del Fs con proteínas transportadoras que se endocitan eficientemente incrementa la eficacia terapéutica de la TFD reduciendo la dosis y evitando la toxicidad del tejido normal que se produce de forma inevitable con los Fs libres. La invención proporciona así medios para destruir las células asociadas a enfermedades proliferativas, como por ejemplo, el cáncer.

Se describirá e ilustrará la invención en más detalle con los siguientes ejemplos.

### 35 **Ejemplos**

#### **Procedimientos generales**

40 Se compraron Hp, anticuerpos anti-transferrina humana de conejo, anticuerpos anti-albúmina sérica bovina de cabra, transferrina, N-hidroxisuccinimida (NHS) y luminol en Sigma-Aldrich Chemical Co. La N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y el tetrahidrofurano (THF) eran de Carlo Erba. El suero de caballo (SC), el suero fetal de ternera (SFT), la L-glutamina y los antibióticos combinados se compraron en Biological Industries Ltd. (Bet Haemek, Israel). Los disolventes para la HPLC eran de Merck.

#### 45 **Células**

50 El U-76 es un hibridoma murino que secreta anticuerpos IgG1 contra dinitrofenol (DNF) y fue un amable regalo del Prof. Eshhar (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). Se cultivaron estas células, así como las células "Friend's Leukemia" (FL), en DMEM que contenía un 15% de SC, 2mM de L-glutamina y antibióticos combinados. Las células humanas K-562 se cultivaron en RPMI/ 15% SC/ glutamina/ antibióticos. Todas las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 6%.

#### **Preparación de CLTs que contienen Hp**

55 Se disolvieron 0.11 mmoles de hematoporfirina clorhidrato en 10 ml de cloroformo y se activaron mediante la adición de 0.173 mmoles de NHS y 0.11 mmoles de DCC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 horas. Después de la evaporación con una corriente de aire, se disolvió el residuo en 2 ml de THF y se añadió lentamente la Hp activada a una solución de 15 mg de transferrina disuelta en 10 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.1M enfriado con hielo. Se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente, se ajustó el pH a 7.5 y se agitó fuertemente durante toda la noche. Los tubos que contenían Hp se protegieron de la exposición a la luz. Se centrifugó la solución del conjugado (7200 x g, 30 mins, 4°C) y se analizó el sobrenadante para el contenido de proteína mediante espectroscopia ( $\lambda = 280$  nm) y Hp ( $\lambda = 400$  nm). Tras la diálisis, una pequeña parte del producto de la reacción en bruto se sometió a cromatografía sobre Sephadex G-50 equilibrado con NaHCO<sub>3</sub> 5mM (pH 8.0) o 10 mM de PBS (pH 7.2). Se recogieron las fracciones que contenían materiales con picos de absorción a 280 y 400 nm y se almacenaron a 4°C.

65

*HPLC:* Tf, Hp y Tf-Hp se sometieron a cromatografía sobre una columna C-18 (3.9mm x 300mm Bondclone, diámetro de partícula 10 Pm, Phenomenex) utilizando un HPLC JASCO -1580 con un detector UV/VIS JASCO 1575. El sistema disolvente estaba compuesto de acetonitrilo-agua con ácido trifluoroacético al 1% y se eluyeron los compuestos con un gradiente lineal (20-100% de acetonitrilo).

5 *Espectro de absorbancia:* se grabó el espectro de absorbancia de las disoluciones PBS de Hp (0.02 mg/ml), Tf (1.4 mg/ml) y Hp-Tf (1.4 mg/ml) con un espectrofotómetro CHEMUSB2-UV-VIS que tiene una resolución óptica de 1nm, red de difracción de 600 líneas por mm, equipado con un detector CCD de matriz. Las muestras se escanearon en la región de absorbancia de 250 – 500 nm.

10 *Actividad Biológica:* se analizó mediante la capacidad de los anticuerpos anti-transferrina o anti-BSA de inhibir la citotoxicidad inducida por la TFD y se evaluó utilizando células FL expuestas a Tf-Hp, bien solo o junto con varias concentraciones de cada anticuerpo.

### 15 **Análisis de la citotoxicidad del CLT**

Se lavaron las células en fase logarítmica tardía de crecimiento con DMED precalentado a 37°C y se cultivaron a 0.5-1 x 10<sup>5</sup> células/ml bien solas o bien con concentraciones crecientes de CLT Tf-Hp durante 2 hrs a 37°C en CO<sub>2</sub> al 6%. Se lavaron entonces las células con DMEM, se expusieron a luz ambiente fluorescente (ratio de fluorescencia = 0.5 mW/cm<sup>2</sup>) durante 12-16 horas y, después, se recultivaron en medio completo durante 24 horas. Se determinó la viabilidad celular mediante exclusión del azul de tripano. Se repitieron los experimentos, al menos, 3 veces. Ya se habían determinado en experimentos preliminares de secuencia temporal los tiempos óptimos de exposición de las células al Fs y la radiación fluorescente.

### 25 **Microscopia de fluorescencia de la endocitosis de Hp y Tf-Hp**

Se cultivaron las células FL sobre portaobjetos en placas del cultivo celular junto con Hp o Tf-Hp y se siguió la fluorescencia incorporada a varios intervalos de tiempo con un microscopio AX70 de Olympus equipado con una lámpara de mercurio de alta presión para la excitación y un conjunto de filtros para la excitación en azul violeta (recorrido de banda de 420-480 nm), espejo dicroico (455 nm) y un filtro barrera de corte selectivo de la emisión del rojo (580 nm). Se analizó la fluorescencia con un objetivo X60, sin añadir ninguna solución anti-blanqueante, y se grabó con la cámara CCD.

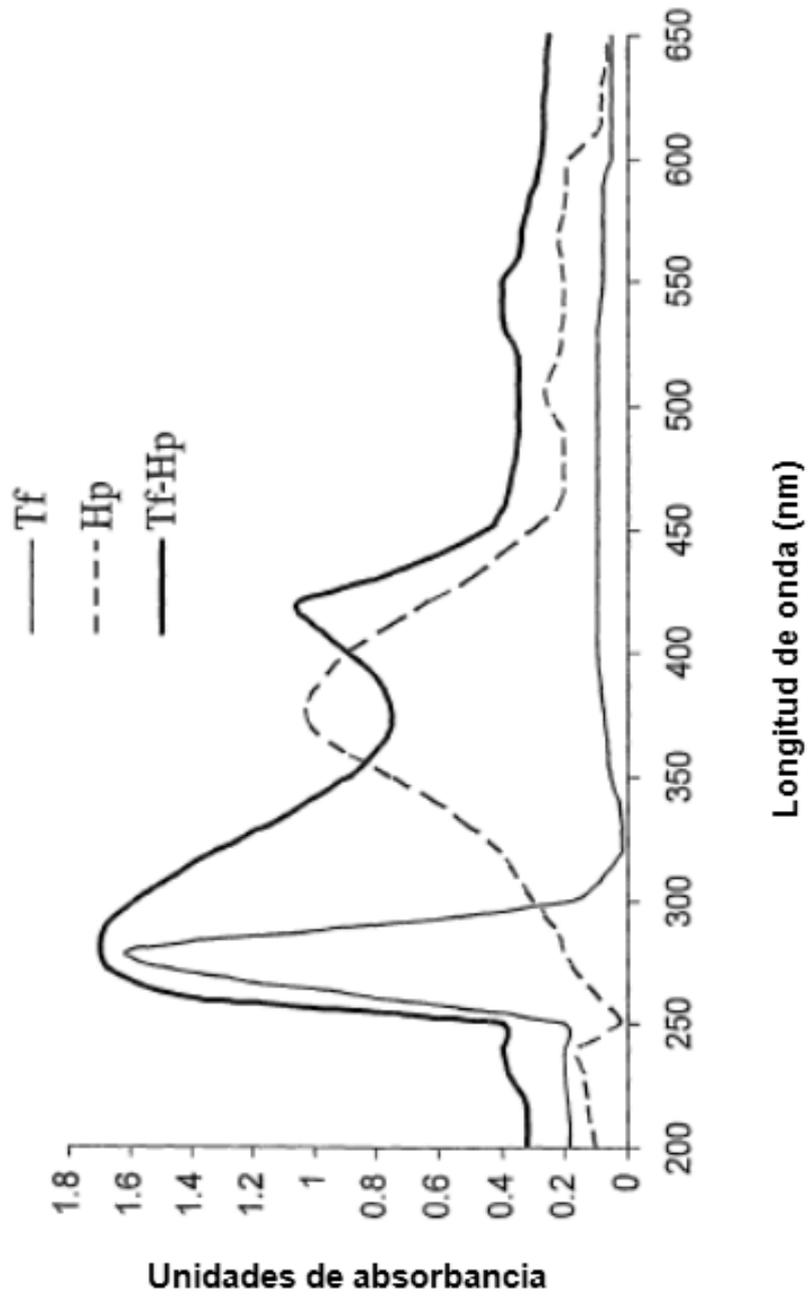
### 35 **Activación intracelular de la TFD por el luminol**

Se lavaron las células FL y se cultivaron durante 20 horas con diferentes concentraciones de Hp o Tf-Hp (0.07, 0.15 ó 0.3 µM) junto con luminol (0-10 µM). La manipulación de las células y los componentes se llevó a cabo con las luces apagadas. Las placas de cultivo se envolvieron en papel de aluminio durante el periodo de cultivo. Posteriormente, los experimentos se dirigieron a evaluar si podría obtener el efecto de la TFD escalonando la exposición de las células a luminol o al conjugado Tf-Hp. Se cultivaron las células FL durante 2 horas en oscuridad a 37°C con Tf-Hp (3 µM), se lavaron y se resuspendieron en medio a una concentración de cultivo estándar. Este procedimiento duró aproximadamente 15 minutos. Después, se mantuvo a las células a 37°C durante 0, 30, 60 ó 90 minutos adicionales, se añadió luminol (10 µM) y se incubaron los cultivos en oscuridad durante 16 horas más. De forma alternativa, se cultivaron primero las células durante 24 horas en oscuridad en presencia de 10 µM de luminol, se lavaron o no, y se cultivaron después durante 24 horas más en presencia de Tf-Hp (0-3 µM) a 37°C. Durante el procedimiento de lavado y manejo de las células, se tuvo especial cuidado en mantener las células en un ambiente oscuro.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un conjugado ligando-toxina (CLT) que comprende un fotosensibilizante (Fs) y un ligando conjugado a éste, en combinación con un agente quimioluminiscente que reacciona con las especies de oxígeno presentes *in situ* y produce luz quimioluminiscente, donde dicho Fs transfiere energía al oxígeno molecular y produce especies reactivas de oxígeno cuando es activado por la luz por dicho agente quimioluminiscente, en la producción de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado a una proliferación incrementada de una población celular, donde dicho ligando tiene afinidad por un componente de la superficie de una célula de dicha población celular, destruyendo así las células en dicha población celular.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde dicho trastorno está asociado con el cáncer o una hiperplasia.
- 15 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho conjugado ligando-toxina y dicho agente quimioluminiscente se utilizan en cualquier orden o simultáneamente.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho ligando en dicho conjugado ligando-toxina comprende un péptido.
- 20 5. Uso según la reivindicación 4, donde dicho péptido es reconocido por un receptor de la superficie de dichas células diana.
6. Uso según la reivindicación 4, donde dicho péptido es transferrina.
- 25 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho Fs comprende hematoporfirina.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho conjugado ligando-toxina comprende transferrina y hematoporfirina conjugada a ésta.
- 30 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho agente quimioluminiscente comprende luminol.
10. Uso según la reivindicación 8, donde dicho agente quimioluminiscente comprende luminol.
- 35 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho agente quimioluminiscente es seleccionado del grupo que consiste en luminol, isoluminol y lucigenina.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho agente quimioluminiscente está acoplado a dicho conjugado ligando-toxina.
- 40 13. Uso según la reivindicación 1, donde dichas células están asociadas a un desorden proliferativo.
14. Uso según la reivindicación 13, donde dichas células son células cancerígenas.
- 45 15. Uso según la reivindicación 13, donde dichas células pertenecen a tejidos corporales internos.
16. Uso según la reivindicación 13, donde dichas células pertenecen a la piel.
- 50 17. Uso según la reivindicación 10, donde la DL<sub>50</sub> de dicho conjugado ligando-toxina es más de 6 veces menor que la DL<sub>50</sub> para la hematoporfirina.
18. Uso según la reivindicación 17, donde dicha DL<sub>50</sub> de dicho conjugado ligando-toxina es casi 20 veces menor que dicha DL<sub>50</sub> para la hematoporfirina.
- 55 19. Uso según la reivindicación 10, donde dicho conjugado ligando-toxina y dicho agente quimioluminiscente actúan de forma sinérgica en la destrucción de las células diana.
20. Composición farmacéutica para ser usada en el tratamiento de una enfermedad proliferativa, en combinación con un conjugado ligando-toxina que comprende un fotosensibilizante (Fs) y un ligando conjugado a éste, la composición comprende luminol como agente quimioluminiscente que activa *in situ* a dicho conjugado ligando-toxina, donde dicho Fs transfiere energía al oxígeno molecular y produce especies reactivas de oxígeno cuando es activado por la luz por dicho luminol, y dicho ligando tiene afinidad por un componente de la superficie de una célula.
- 60 21. Composición farmacéutica que comprende un conjugado ligando-toxina que comprende un fotosensibilizante y un ligando conjugado a éste, dicho conjugado ligando-toxina tiene un agente quimioluminiscente acoplado a éste, el cual reacciona con las especies de oxígeno presentes *in situ* y produce luz quimioluminiscente, donde dicho
- 65

fotosensibilizante transfiere energía al oxígeno molecular y produce especies reactivas de oxígeno cuando es activado por la luz por dicho agente quimioluminiscente, y dicho ligando tiene afinidad por un componente de la superficie de una célula



**Fig. 1**

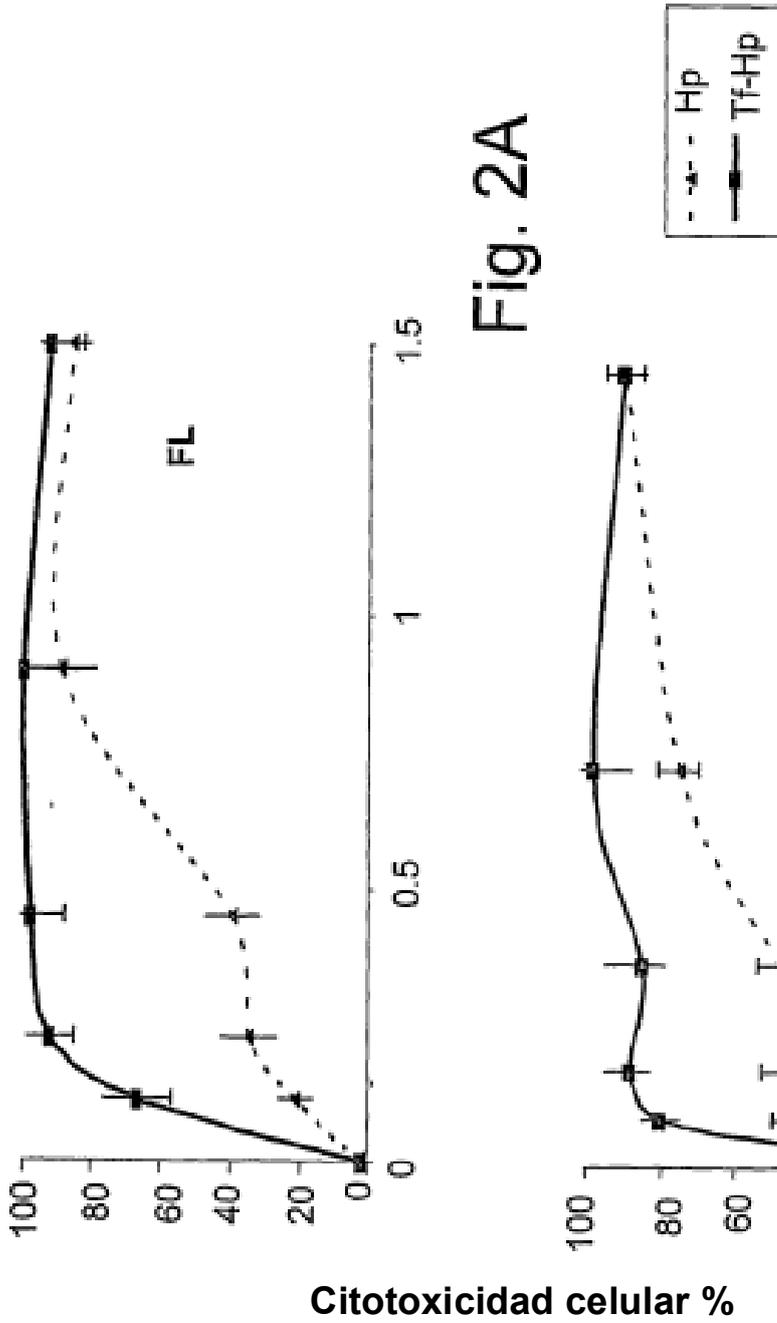


Fig. 2A

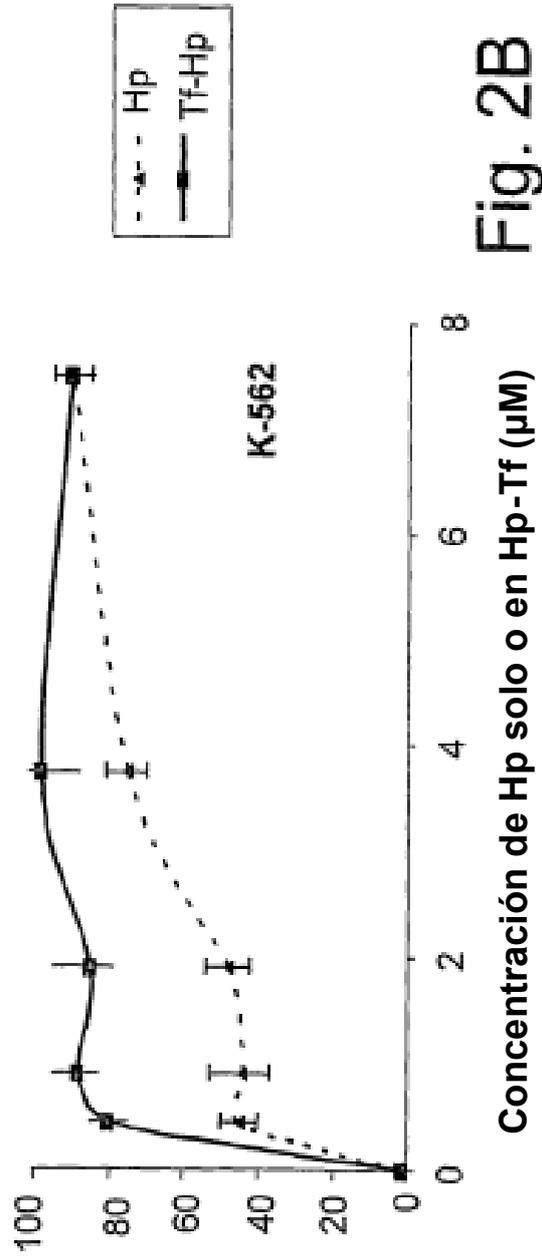


Fig. 2B

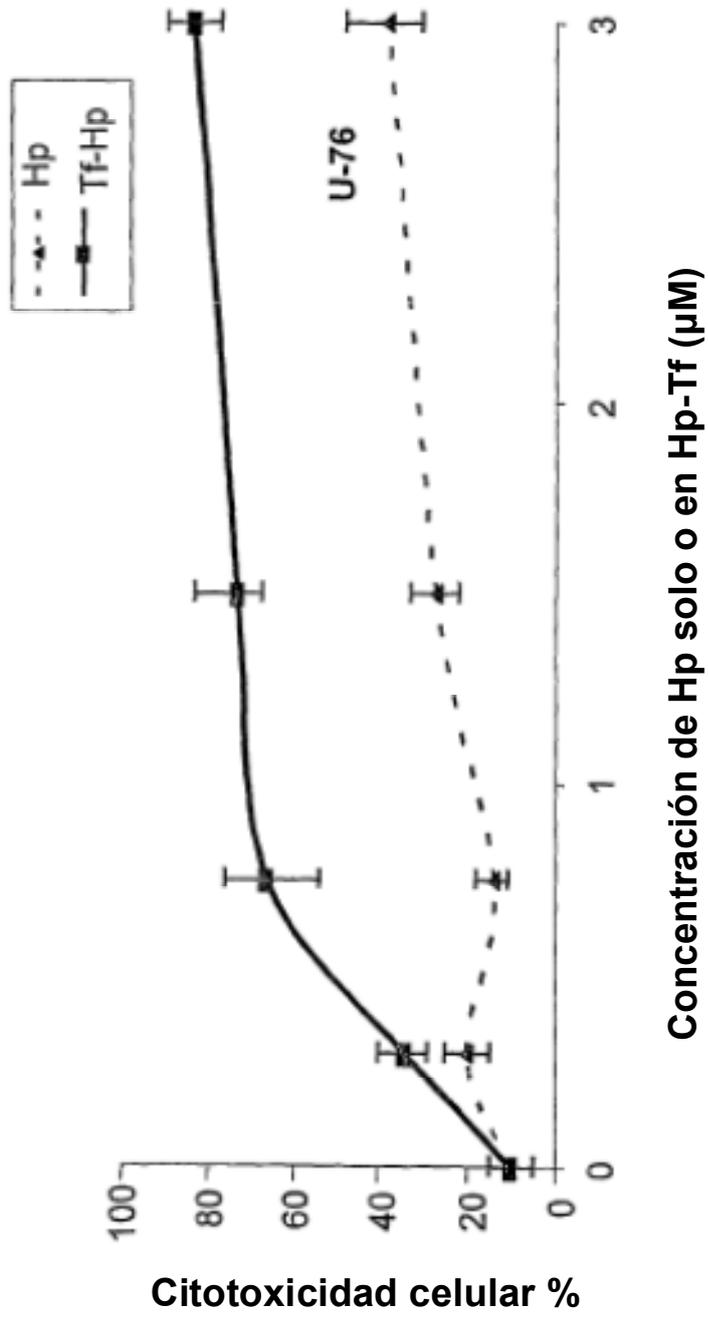


Fig. 2C

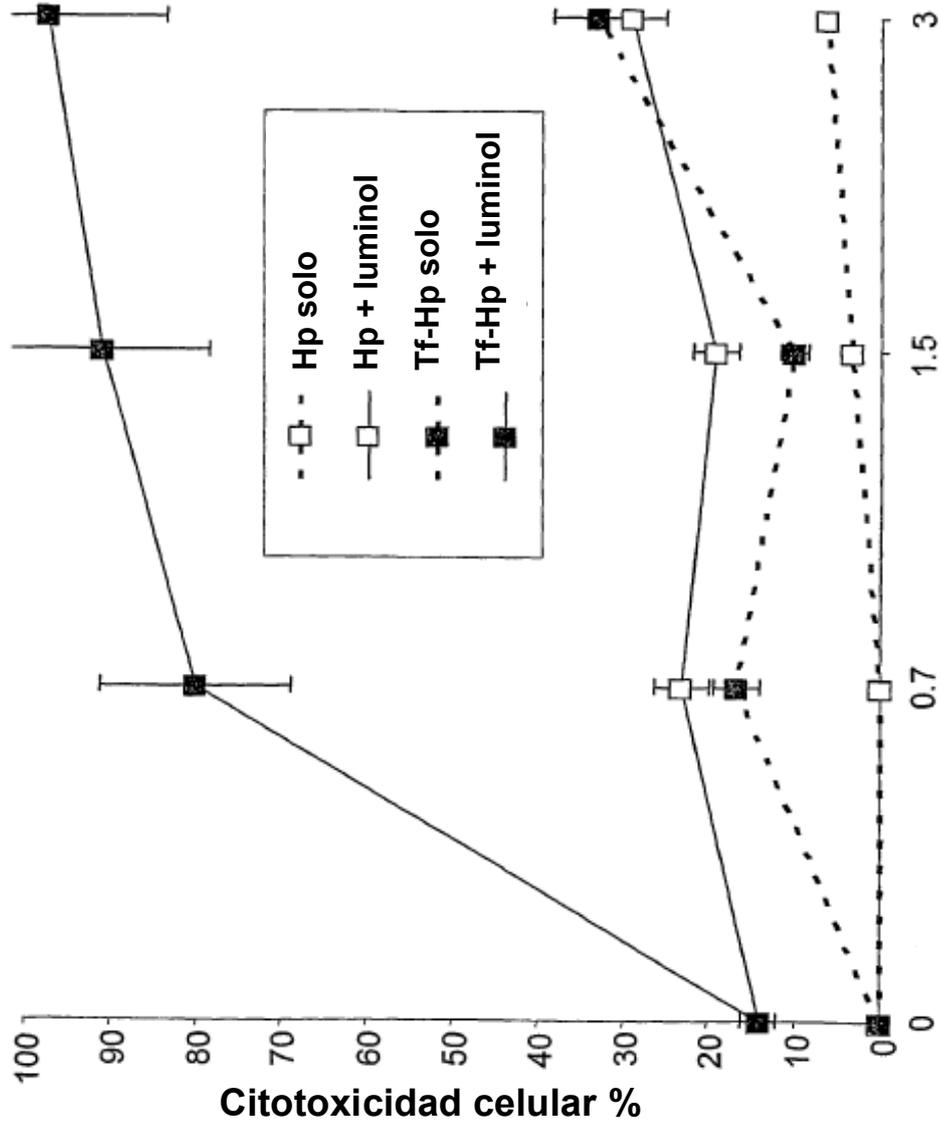
**Tabla 1**

Parámetro	Tipo celular		
	FL	K-562	U-7
Concentración a DL <sub>50</sub> (µM)			
Hp	0.55	1.9	NA
Tf-Hp	0.08	0.3	0.5
Proporción#	6.88	6.33	-----
Concentración a DL <sub>90</sub> (µM)			
Hp	NA	7.5	NA
Tf-Hp	0.18	1.0	>3.5
Proporción#	-----	7.5	-----
Concentración a DL <sub>MÁX</sub> (µM)			
Hp	0.89	7.5	3.0
Tf-Hp	0.45	3.75	3.0
Proporción#	1.98	2.0	1.0
% Citotoxicidad Celular a DL <sub>MÁX</sub>			
Hp	84	90	40
Tf-Hp	100	100	85
Proporción#	0.84	0.90	0.47

#: Proporción de Hp/Tf-Hp

NA: No alcanzado

**Fig. 3**



Concentración de Hp solo o en Hp-Tf (µM) Fig. 4

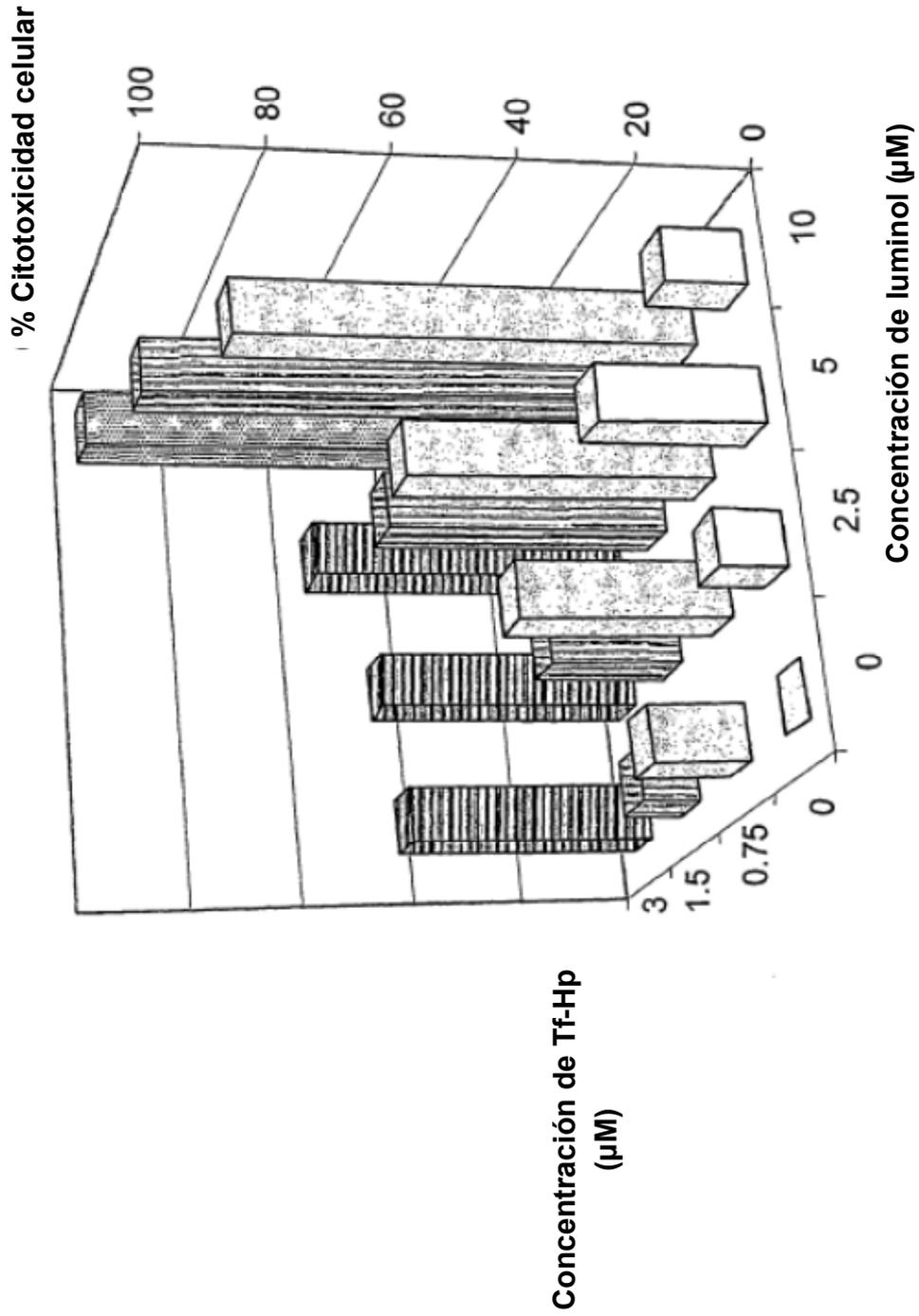


Fig. 5

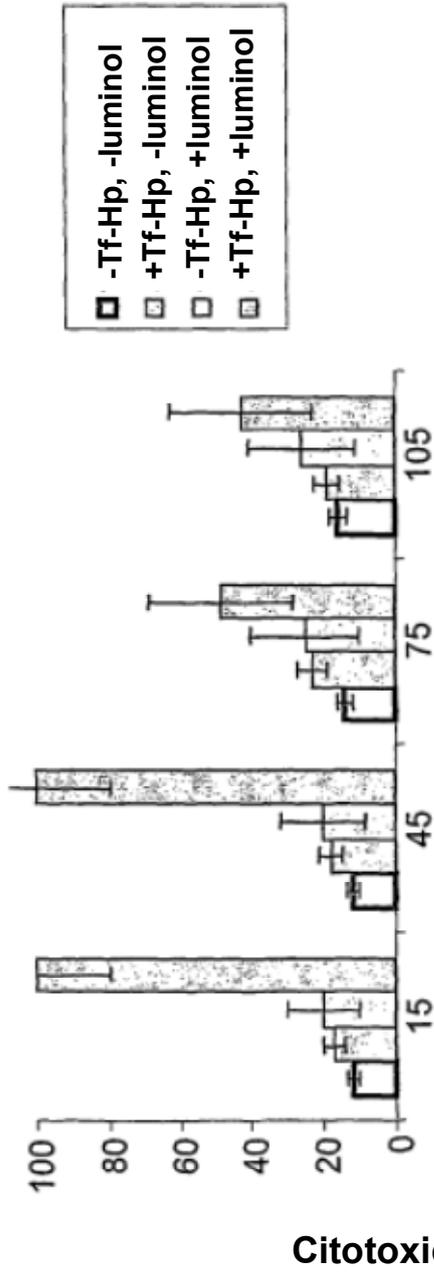


Fig. 6A

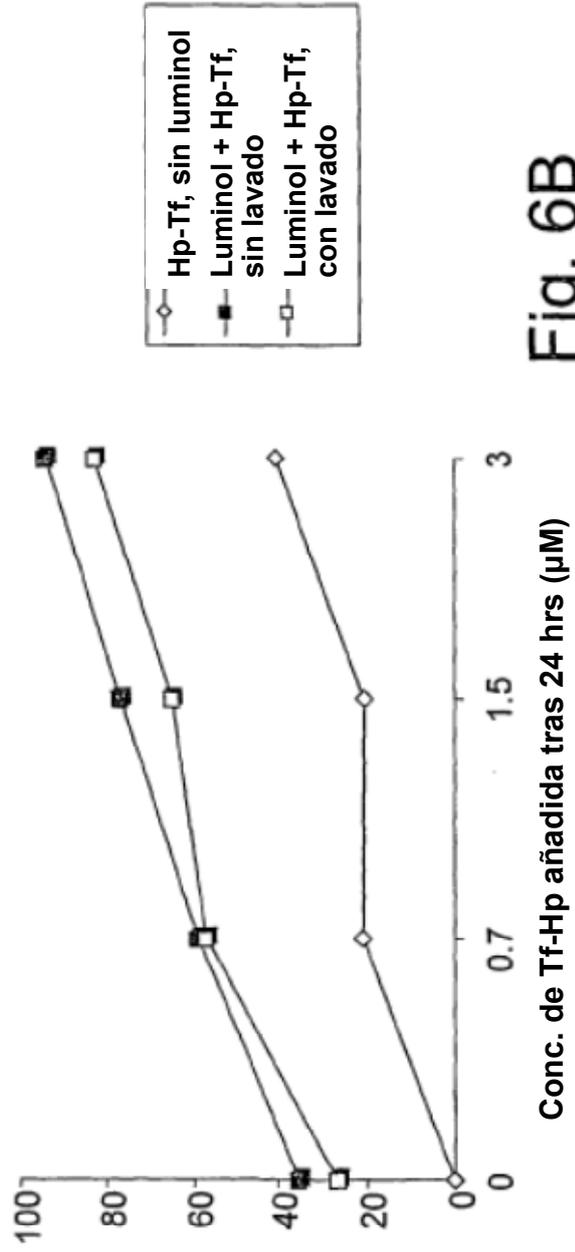


Fig. 6B

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.*

**Literatura no patente citada en la descripción**

- **MRSNY R.J.** Expert Opinion on Biological Therapy, 2004, vol. 4, 65-73 **[0002]**
- **FIRER M.A. et al.** Leukemia and Lymphoma, 2003, vol. 44, 681-9 **[0002]**
- **SHARMAN W.M. et al.** Adv. Drug Delivery Rev., 2004, vol. 56, 53-76 **[0002]**
- **BROWN S.B. et al.** Lancet Oncol., 2004, vol. 5, 497-508 **[0002]**
- **PONKA P. et al.** Sem. Hematol., 1998, vol. 35, 35-54 **[0002]**
- **HAMBLIN M.R. et al.** J. Photochem. Photobiol., 1994, vol. 26, 45-56 **[0002] [0018]**
- **RITTENHOUSE-DIAKUN K. et al.** Treat., March 2002, vol. 72 (2), 117-130 **[0002]**
- **GIJSENS A. et al.** Int. J. Cancer., 2002, vol. 101, 78-85 **[0002]**
- **LI H. et al.** Med. Res. Rev., 2002, vol. 22, 225-50 **[0002]**
- **CARPENTER S. et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, December 1994, vol. 91, ISSN 0027-8424, 12273-12277 **[0002]**
- **PHILLIP M.J. et al.** Oncology, 1989, vol. 46, 266-72 **[0002]**
- **KRICKA J.L.** Ann. Clin. Biochem., 2002, vol. 39, 114-29 **[0003]**
- **TEMPLIN M.F. et al.** Drug. Discov. Today, 2002, vol. 7, 815-22 **[0003]**
- **NEMETH A. et al.** Biochem. Biophys. Res. Comm., 1999, vol. 255, 360-6 **[0003]**
- **Cancer Research**, 15 April 2003, vol. 63 (8), ISSN 0008-5472, 1818-1821 **[0004]**
- **WEAVER M. et al.** J Neurooncol., 2003, vol. 65, 3-13 **[0018]**
- **SINGH M. et al.** Anticancer Res., 1998, vol. 18, 1423-7 **[0018]**
- **DOLMANS D.E. et al.** Nature Reviews Cancer, 2003, vol. 3, 380-7 **[0018]**
- **SUPINO R. et al.** Chem. Biol. Interact., 1986, vol. 57, 258-94 **[0021]**
- **LUKSIENE Z. et al.** Medicina, 2003, vol. 39, 677-82 **[0021]**
- **CARPENTER S. et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, December 1994, vol. 91, ISSN 0027-8424, 12273-12277 **[0021]**