

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 459 015**

(51) Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2006 E 06794684 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2014 EP 1933875**

(54) Título: **Conjugados de fotosensibilizadores y fragmentos de anticuerpo**

(30) Prioridad:

07.10.2005 GB 0520436

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.05.2014

(73) Titular/es:

**PHOTOBIOTICS LIMITED (100.0%)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY IMPERIAL
COLLEGE, EXHIBITION ROAD
LONDON SW7 2AZ, GB**

(72) Inventor/es:

**DEONARAIN, MAHENDRA;
YAHIOGLU, GOKHAN y
BHATTI, MANPREET**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 459 015 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 fotosensibilizadores y fragmentos de anticuerpo

- 5 La invención se refiere a terapia fotodinámica (PDT) para la destrucción selectiva de células malignas, enfermas o infectadas o agentes infecciosos sin provocar daño en células normales. Esto puede conducir a un tratamiento clínico más eficaz.
- 10 El tratamiento actual de enfermedad es, predominantemente, no dirigido. Se administran fármacos por vía sistémica o por vía oral que exponen muchos otros tejidos así como los tejidos que están enfermos. En terapia de cáncer, los fármacos quimioterapéuticos son específicos para células que están creciendo y se dividen rápidamente ya que actúan principalmente por un mecanismo que interfiere con la replicación del ADN [1] (Para detalles de todas las referencias, véase sección de referencias posterior). Otras células pueden captar el fármaco y también intoxícase, tales como células madre de médula ósea que se dividen rápidamente, dando como resultado inmunosupresión y enfermedad. En enfermedades infecciosas, el fármaco antibacteriano se introduce en la sangre (por vía oral o por inyección) e interfiere con una ruta metabólica bacteriana particular. La exposición de otros tejidos al fármaco puede dar como resultado efectos secundarios así como el principal problema de la resistencia farmacológica. Las células infectadas por virus son difíciles de tratar ya que su metabolismo es prácticamente idéntico a células humanas no infectadas.
- 15 20 Se ha postulado generalmente la hipótesis de que los avances de la medicina pueden estar en la adaptación de los fármacos a la enfermedad. Esto significa, entre otros, suministrar el producto terapéutico al tejido u organismo diana correcto, en lugar del enfoque de acierto y error no selectivo de la mayoría de los fármacos convencionales usados en la actualidad. Esto dará como resultado la administración de dosis menores, menores efectos secundarios y toxicidades, y mejores respuestas generales. Los avances en la genómica significarán algún día que los fármacos puedan adaptarse al individuo, ya que el cáncer de mama en un individuo puede diferir del cáncer de mama en otro individuo.
- 25 30 Existen muchos fármacos usados clínicamente en la actualidad que son muy buenos en la destrucción o tratamiento de las células enfermas, una vez que el fármaco se ha acumulado en el tejido correcto. Por lo tanto, el problema está en la dirección específica de fármacos en lugar de sus mecanismos de acción. Los ejemplos de esto incluyen radiación ionizante dirigida a diferencia de radioterapia de haz externo [2], fármacos quimioterapéuticos dirigidos (por ejemplo, metotrexato o doxorrubicina) a diferencia de fármacos libres [3] y toxinas [4]. La PDT es un ejemplo particularmente bueno ya que ya está bien establecida en muchos tratamientos, pero se está haciendo evidente que un mejor resultado terapéutico, y en consecuencia aplicaciones clínicas expandidas en gran medida, vendrán de la predirección del fármaco sensibilizador a los tejidos correctos además de dirección de la fuente de luz, que no es precisa al nivel celular [5,6].
- 35 40 La dirección de fármacos u otros efectores a las células deseadas es un área bien establecida. Uno de los principales enfoques de la dirección es usar anticuerpos o ligandos específicos de células como el elemento de dirección de una molécula multifuncional [7,8]. Un buen diseño para dicha molécula multifuncional sería uno que sea altamente específico para células enfermas, capaz de portar muchos fármacos con alta capacidad sin comprometer su función y capaz de depositar el fármaco en el compartimento subcelular que se vería afectado principalmente.
- 45 50 Los anticuerpos han evolucionado de forma natural para actuar como la primera línea de defensa en el sistema inmunitario de mamíferos. Son glucoproteínas complejas que tienen especificidad exquisita y enorme diversidad. Esta diversidad surge de combinación de genes programada y mutagénesis dirigida, dando como resultado probablemente un billón de secuencias de anticuerpo diferentes [9]. Esta diversidad significa que los anticuerpos pueden unirse prácticamente a cualquier molécula diana que es habitualmente de naturaleza proteica. Es posible en la actualidad imitar la selección y producción de anticuerpo *in vitro*, seleccionando anticuerpos humanos recombinantes contra prácticamente cualquier diana deseada [10].
- 55 60 Esta selectividad antigenética que se confiere por dominios variables y es independiente de los dominios constantes, se conoce de experimentos que implican la expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpo, que contienen todos uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas de tipo Fab (Better *et al.* (1988) Science 240, 1041); moléculas Fv (Skerra *et al.* (1988) Science 240, 1038); moléculas Fv monocatenarias (ScFv) en las que los dominios compañeros V_H y V_L están unidos mediante un oligopeptido flexible (Bird *et al.* (1988) Science 242, 423; Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) y anticuerpos de dominio sencillo (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward *et al.* (1989) Nature 341, 544). Una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpo que conservan sus sitios de unión selectiva se encontrará en Holliger y Hudson, Nature Biotechnology (2005) 23, 1126-36.
- 65 Un número significativo de fármacos biotecnológicos que están en desarrollo se basan en dirigir anticuerpos [7,11,12]. La técnica de selección *in vitro* más popular es la presentación en fagos de anticuerpos, en la que los anticuerpos se presentan y manipulan en la superficie de virus [10].

La presentación de proteínas y polipéptidos en la superficie de bacteriófagos (fagos), fusionados con una de las proteínas de cubierta del fago proporciona una herramienta poderosa para la selección de ligandos selectivos. Esta técnica de "presentación de fagos" se usó originalmente por Smith en 1985 (Science 228, 1315-7) para crear grandes bibliotecas de péptidos para el fin de seleccionar los que tuvieran una alta afinidad por un antígeno particular. Más recientemente, el método se ha empleado para presentar anticuerpos en la superficie de fagos para identificar ligandos que tengan propiedades deseadas (McCafferty *et al.*, Nature, 1990, 552-554).

El uso de presentación de fagos para aislar ligandos que se unan con moléculas biológicamente relevantes se ha revisado en Felici *et al.* (1995) Biotechnol. Annual Rev. 1, 149-183, Katz (1997) Annual Rev. Biophys. Bionaoil. Struct. 26, 27-45 y Hoogenboom Nature Biotechnology (2005) 23, 1105-16.

Se están desarrollando muchos anticuerpos terapéuticos para una serie de enfermedades, principalmente cáncer, enfermedades autoinmunitarias y prevención de rechazo de aloinjertos. La Tabla 1 enumera algunos de estos anticuerpos importantes.

15

Tabla 1 Usos terapéuticos de anticuerpos (adaptada de [11,12])

Anticuerpo	Diana	Aplicación
Herceptin (trastuzumab)	Receptor ErbB2 (Her 2)	Terapia de cáncer de mama
Rituxan (rituximab)	CD20	Linfoma
Theragyn (pemtumomab)	Muc-1	Cáncer ovárico
Remicade (infliximab)	TNF-alfa	Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn
Zenapax (daclizumab)	CD25	Rechazo de aloinjertos
Panorex (edrecolomab)	Antígeno de superficie 17-1A	Cáncer colorrectal
Vitaxin	Integrina alfa Vbeta3	Sarcoma
Protovir	Citomegalovirus (CMV)	Infección por CMV
MFE-23	Antígeno carcinoembrionario	Cáncer colorrectal
Amevive (alefacept)	CD11a	Psoriasis
Bexxar (I^{131} -tositumomab)	CD-20	Linfoma
Mylotarg (ozogamicina de gemtuzumab)	CD-33	Leucemia

Los anticuerpos pueden unirse con un alto grado de especificidad con células diana que expresan el receptor apropiado. La afinidad de un anticuerpo es una medida de lo bien que un anticuerpo se une con la diana (antígeno). Habitualmente se describe por una constante de disociación en equilibrio (Kd). Para anticuerpos que es necesario internalizar, la velocidad de asociación es más importante ya que la velocidad de disociación no es aplicable si el anticuerpo se lleva dentro de la célula. Existen diversas tecnologías para seleccionar y manipular anticuerpos que tienen propiedades estructurales y de unión deseadas [13].

Como con todas las moléculas biológicas, el tamaño del anticuerpo afecta a su farmacocinética *in vivo* [14,15]. Moléculas mayores persisten más tiempo en la circulación debido a eliminación lenta (se eliminan glucoproteínas grandes mediante captación específica por el hígado). Para anticuerpos completos (peso molecular de 150 KDa) que reconocen un antígeno de células cancerosas en un sistema de modelo de ratón experimental, el 30-40 % puede captarse por el tumor, pero debido a que persisten más tiempo en la circulación, se tardan 1-2 días en alcanzar una relación de tumor:sangre de más de uno. Las relaciones típicas de tumor:sangre son de 5-10 aproximadamente el día 3 [16]. Con fragmentos menores de anticuerpos, que se han producido por técnicas *in vitro* y tecnología de ADN recombinante, la eliminación de la circulación es más rápida (las moléculas menores de aproximadamente 50 KDa se excretan a través de los riñones). Los Fv de cadena sencilla (aproximadamente 30 KDa) son moléculas de unión artificiales derivadas de anticuerpos completos, pero contienen la parte mínima requerida para reconocer antígenos [17]. De nuevo en sistemas de modelo de ratón, los scFv pueden suministrar 1-2 % de la dosis inyectada, pero con relaciones de tumor:sangre mejores de 20:1, con algunas relaciones de tumor:órgano incluso mejores [18]. Como los scFv se han desarrollado solamente durante los últimos 10 años, no hay muchos ejemplos en ensayos clínicos tardíos [19]. A partir de ensayos clínicos de anticuerpos completos, la cantidad suministrada de hecho a tumores es aproximadamente el 1 % de la vista en modelos de ratón, pero con relaciones tumor:órgano similares [20]. Si se une otra molécula al anticuerpo, entonces el nuevo tamaño y propiedades físico químicas determinan la farmacocinética alterada. Adicionalmente, propiedades tales como carga neta e hidrofilia pueden efectuar la cinética de dirección [21].

Algunos antígenos de superficie celular son estáticos o se internalizan muy lentamente cuando se unen con un ligando tal como un anticuerpo. Hay algunos que tienen una función que requiere internalización, tal como señalización celular o captación de metales y lípidos. Los anticuerpos pueden usarse para suministrar agentes por vía intracelular mediante dichos antígenos. Estos agentes pueden ser terapéuticos, reparando o destruyendo células enfermas. Los ejemplos incluyen suministro génico [22], el suministro intracelular de toxinas (por ejemplo, exotoxina de *Pseudomonas* [4]), enzimas (por ejemplo ribonucleasa [23], desoxirribonucleasa [24]) y fármacos (por ejemplo metotrexato [3]). Es necesario dirigir algunos de estos agentes a orgánulos subcelulares particulares para ejercer sus efectos [24]. Los avances en la biología celular han descubierto "códigos" de dirección intracelular; estos son secuencias de aminoácidos que dirigen las proteínas intracelulares a ciertos compartimentos subcelulares. Hay secuencias específicas que se ha descubierto que dirigen diversas proteínas al núcleo, retículo endoplásmico, Golgi, lisosomas y mitocondrias ([25], Tabla 2). Estos se están desarrollando como complementos para mejorar la acción farmacológica localizando proteínas terapéuticas en el compartimento diana.

Tabla 2 Secuencias peptídicas que podrían usarse para localización subcelular

Nombre de la Secuencia	Función	Secuencia de Aminoácidos
Localización nuclear T grande de SV40	Dirige polipéptidos al núcleo	KKKKRPR
SRY humano	Dirige polipéptidos al núcleo	KRP MNAFIVWSRDQR RK
Péptido N terminal de proteína de unión a ATP que contiene dirección a mitocondrias	Dirige polipéptidos a la mitocondria	MLVHLFRVGIRGGPFP GRLLPPLRFQTFSAVR YSDGYRSSSLLRAVAH LPSQLWA
Dirección a membrana lisosómica	Dirige polipéptidos a los lisosomas	TMGY o TMLI
Señal de Retención en el retículo endoplásmico (RE)	Permite que las proteínas viajen de vuelta al RE	KDEL
Hemaglutinina de Gripe HA2	Rompe la membrana	GLFGAIAGFIENGWEG MIDGWYG
vp1 de virus de la polio	Rompe la membrana	GIEDLISEVAQG ALTLV P
Defensina humana	Rompe la membrana	ACYCRIPTACIAGERRY GTCIYQGRLWAFCC
Proteína F1 de fusión del virus Sendai	Rompe la membrana	FFGA VIGTIALGVATSA QITAGIALAEAR

Ha habido mucha investigación sobre fármacos terapéuticos dirigibles en la que se han ligado funciones efectoras nuevas con anticuerpos u otros ligandos de dirección. Es necesario internalizar algunos de estos para suministrar con éxito un agente tóxico. Muchos de estos han mostrado buenos resultados *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, pero han sido decepcionantes en la clínica. Las inmunotoxinas han mostrado problemas tales como reacciones inmunitarias y toxicidad al hígado/riñón [26]. Ha habido avances con nuevas inmunotoxinas "humanizadas" basándose en enzimas tales como ribonucleasa [23] y desoxirribonucleasa [24]. Estas potencialmente tienen efectos secundarios menores, son más tolerables, pero aún así no tienen un efecto de destrucción de espectadores. Los fármacos quimioterapéuticos tienden a ser mucho menos activos cuando se unen a proteínas ya que no se liberan eficazmente, requiriendo de este modo enlazadores químicos selectivamente escindibles. La radioinmunoterapia tiende a irradiar a otros tejidos de camino al tumor, proporcionando toxicidad de médula ósea e hígado. Los

fármacos fotosensibilizadores (PS) son agentes particularmente atractivos para unir a proteínas ya que los elementos citotóxicos son el oxígeno singlete y otras especies de oxígeno reactivas generadas a partir de ellos y no los fármacos PS en sí mismos [5,6].

- 5 Aunque los anticuerpos son la primera elección cuando se trata de considerar ligandos para dirección o detección, existen muchos ligandos alternativos, algunos de los cuales se han aprovechado mediante técnicas de presentación/selección de fagos (u otras). Estos incluyen ligandos naturales para receptores (por ejemplo, interleucina 6 (IL-6) [27] y factor de necrosis tisular (TNF) [8], péptidos (por ejemplo, neuropéptidos [28]), dominios de tipo inmunoglobulina (tales como dominios de fibronectina (fn3) [29], dominios de inmunoglobulina individuales [30]), anticalinas [31], repeticiones de anquirina [32], etc. Muchos de estos pueden modificarse por ingeniería genética y optimizarse para mejorar sus propiedades biológicas y terapéuticas [33].

10 La Terapia Fotodinámica (PDT) es un tratamiento mínimamente invasivo para una serie de afecciones en las que es necesario retirar células y tejidos enfermos [6,34,35]. A diferencia de la radiación ionizante, se puede administrar repetidas veces en el mismo sitio. Su uso en el tratamiento de cáncer es atractivo debido a que el uso de modalidades convencionales tales como quimioterapia, radioterapia o cirugía no excluye el uso de PDT y viceversa. La PDT también encuentra otras aplicaciones en las que deben destruirse poblaciones celulares específicas, tales como vasos sanguíneos (en degeneración macular relacionada con la edad (AMD [36]) o en cáncer), el tratamiento de trastornos inmunitarios [37], enfermedad cardiovascular [38], e infecciones microbianas [39,40].

20 25 La PDT es un proceso de dos etapas o binario que comienza con la administración del fármaco PS, por inyección intravenosa, o aplicación tópica para cáncer de piel. La naturaleza físico química del fármaco hace que se capte preferentemente por células cancerosas u otras células diana [41]. Una vez que se ha obtenido una relación de órgano normal:tumor (u otra diana) favorable, la segunda etapa es la activación del fármaco PS con una dosis específica de luz, a una longitud de onda particular. El fotosensibilizador, en su estado fundamental o singlete absorbe un fotón de luz a una longitud de onda específica. Esto da como resultado un estado de singlete excitado de vida corta. Este puede convertirse por cruce entre sistemas en un estado triplete de vida más larga. Es esta forma del sensibilizador la que lleva a cabo diversas acciones citotóxicas.

30 35 40 Las principales clases de reacciones son fotooxidación por radicales (reacción de tipo I), fotooxidación por oxígeno singlete (reacción de tipo II), y fotoreacción que no implica oxígeno (reacción de tipo III). La forma de estado triplete del sensibilizador provoca la conversión de oxígeno molecular hallado en el ambiente celular en especies de oxígeno reactivo (ROS), principalmente oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) mediante una reacción de Tipo II. Si un fotosensibilizador activado interacciona con componentes celulares, se produce una reacción de Tipo I en la que se extraen electrones o protones formando radicales tales como radicales de hidroxilo (OH^\bullet y superóxido (O_2^\bullet)). Estas especies moleculares provocan daños a componentes celulares tales como ADN, proteínas y lípidos [42]. También se ha propuesto un mecanismo de Tipo III en el que el fotosensibilizador en estado de triplete interacciona con radicales libres para provocar daño celular. El sitio del daño celular depende del tipo de fotosensibilizador, longitud de incubación, tipo de células y modo de suministro. Los fotosensibilizadores hidrófobos tienden a dañar membranas celulares [42] mientras que los fotosensibilizadores catiónicos se localizan dentro de vesículas de membrana tales como mitocondrias y provocan daño allí [43].

45 50 55 La activación por luz de ROS es altamente citotóxica. De hecho algunos procesos naturales en el sistema inmunitario utilizan ROS como un modo de destruir células no deseadas. Estas especies tienen un tiempo de vida más corto (<0,04 ms) y actúan en un radio corto (<0,04 mm) desde su punto de origen. La destrucción de células conduce a un área de tipo necrótico de tejido que con el tiempo se desprende o se reabsorbe. El tejido restante se cura de forma natural, habitualmente sin cicatrización. No hay calentamiento tisular y el tejido conectivo tal como el colágeno y elastina no se ven afectados. Esto da como resultado menor riesgo a las estructuras subyacentes en comparación con técnicas de láser térmico, cirugía o radioterapia de haz externo. Una investigación más detallada ha mostrado que la PDT induce apoptosis (muerte celular no inflamatoria) y la necrosis resultante (isis celular inflamatoria) vista se debe a la masa de células moribundas que no se elimina por el sistema inmunitario [44]. La investigación de varios fármacos PS incluyendo ftalocianinas de silicio ha mostrado que la PDT induce apoptosis, muerte celular programada [45]. La apoptosis es la forma altamente orquestada y evolutivamente conservada de muerte celular en la que las células se suicidan cuidadosamente dividiéndose en trozos empaquetados por membrana [46]. Estos cuerpos apoptóticos se marcan para fagocitosis por el sistema inmunitario. Habitualmente, demasiada apoptosis en un área pequeña "sobrecarga" del sistema inmunitario y el área con el tiempo se vuelve necrótica; con consecuencias inflamatorias.

60 La PDT es una reacción fotoquímica fría, es decir la luz de láser usada no es ionizante y suministra niveles bajos de energía térmica, y los fármacos PS tienen toxicidad sistémica muy baja. La combinación de fármaco PS y luz da como resultado baja morbilidad y mínima perturbación funcional y ofrece muchas ventajas en el tratamiento de enfermedades. Existen pruebas crecientes de que las tasas de respuesta a PDT y durabilidad de las respuestas son tan buenas como o incluso superiores a las terapias locoregionales convencionales [35,36].

65 Generalmente se administran fármacos PS por vía sistémica, con algunas aplicaciones tópicas para lesiones cutáneas. Cuando el fármaco PS se ha acumulado en el tejido diana, con relaciones normalmente de 2-5:1 en

- comparación con tejidos circundantes normales (excepto en el cerebro en el que la relación puede ser hasta 50:1), se dirige luz de baja potencia de una longitud de onda particular al tumor (o el ojo en el tratamiento de AMD [37]). Debido a que el tejido humano puede transmitir la luz más eficazmente en la región roja del espectro de luz visible, los fármacos PS que pueden absorber luz roja (630 nm o superior) pueden activarse hasta una profundidad de aproximadamente 1 cm. Después del tratamiento debe evitarse la luz solar directa hasta que los fármacos PS administrados por vía sistémica se eliminen del cuerpo, de lo contrario pueden tener fotosensibilidad cutánea, dando como resultado quemaduras cutáneas.
- La última generación de fármacos PS tienen longitudes de onda de activación más largas permitiendo de este modo una penetración tisular más profunda por luz roja, mayor rendimiento cuántico y mejor farmacocinética con respecto a selectividad tumoral y fotosensibilidad cutánea residual. Estas clases de fármacos PS incluyen las ftalocianinas, clorinas, texafirinas y purpurinas. La clorina sintética, Foscan™ es un fármaco PS muy potente con una longitud de onda de activación de 652 nm, rendimiento cuántico de 0,43 y fotosensibilidad cutánea de aproximadamente 2 semanas. Ha habido muchos ensayos clínicos para diversos cánceres, con buenos resultados [35,36]. Hay otros fármacos PS que se han desarrollado y están en pruebas que pueden absorber a >700 nm, tales como metatetrahidrofenil bacterioclorina (m-THPC). Se ha desarrollado un fotosensibilizador de paladio-bacteriofeoforbla (TOOKAD) que es prometedor en el tratamiento del cáncer de próstata con propiedades de absorción de rojo profundo, favorables (pico de absorción a 763 nm) [47].
- Los estudios preclínicos han mostrado que el fraccionamiento de la dosis de luz da como resultado efectos de PDT potenciados, permitiendo que el oxígeno reabastezca al sistema antes del siguiente ciclo de activación. Esto se ha observado para el fármaco de Miravant MV6401 en un modelo de cáncer de mama ortotópico [48]. La bibliografía describe otros modos de potenciar los efectos de PDT no dirigidos tales como el uso de análogos de vitaminas administrados por separado para modular la ruta de radicales libres [49], el acoplamiento de fotosensibilizadores (por ejemplo m-THPC) a vehículos de polietilenglicol para aumentar su semivida [50], el uso de vehículos de micelas poliméricas [51] y el uso de adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria después de tratamiento con PDT [52].
- El esquema de tratamiento con PDT es atractivo para el especialista clínico porque pueden tratarse habitualmente enfermedades superficiales con anestesia local y sedación [35]. La toxicidad generalmente baja (con la posible excepción de fotosensibilidad cutánea) limita la necesidad de otra medicación. Los tratamientos tópicos no requieren condiciones estériles y pueden proporcionarse en una clínica ambulatoria.
- Photofrin™ (porfímero sódico), ácido 5-aminolevulínico (ALA) y Visudyne™ (verteporfina; monoácido derivado de benzoporfirina BPD-MA) son tres fármacos PS que tienen aprobación reguladora. Un fármaco PS de segunda generación potente, prometedor, Foscan™ (temoporfinina; meta-tetrahidroxifenil clorina) se ha aprobado recientemente en Europa, así como metil-5-aminolevulinato. El porfímero sódico; el primer fármaco PS aprobado, tiene licencia para su uso en cáncer de vejiga, estómago, esófago, cuello uterino y pulmón. Su rendimiento es moderado debido a bajas características de absorción de la luz en el extremo rojo del espectro (activado a 630 nm), lo que significa que solamente puede penetrar aproximadamente 5 mm en los tejidos, y selectividad limitada para tejido tumoral diana. También persiste en el cuerpo durante semanas, lo que conduce a fotosensibilidad cutánea. Sin embargo, ha sido eficaz en el tratamiento de cánceres de vejiga, estómago, esófago, cuello uterino y pulmón [35,36]. ALA se aplica por vía tópica en el tratamiento de lesiones cutáneas y se convierte de forma endógena en protoporfirina IX, una molécula PS de región natural. Esta puede activarse a muchas longitudes de onda y su profundidad de efecto es inferior a 2 mm. La verteporfina también tienen un buen rendimiento en degeneración macular relacionada con la edad AMD [37,53], sin los problemas de penetración tisular hallados en aplicaciones tumorales. Los ensayos Clínicos de TAP y VP han mostrado que la PDT con verteporfina fue más eficaz en la recuperación de pérdida de la visión asociada con AMD en comparación con el control de placebo [53].
- La PDT puede conseguir tasas de control similares a técnicas convencionales con tasas de morbilidad menores, simplicidad de uso y mejor resultado funcional y cosmético. La PDT se ha usado principalmente cuando los enfoques convencionales han fallado o son inadecuados. Estos incluyen lesiones displásicas premalignas y cánceres no invasivos que se encuentran habitualmente en la mucosa de los tractos aerodigestivo y urinario (por ejemplo, cavidad oral, esófago y vejiga). Los tratamientos actuales para el cáncer en este estadio no son muy exitosos y unas buenas respuestas aquí impedirían la aparición de tumores sólidos mayores o propagaciones metastásicas. El tratamiento para esófago de Barrett habitualmente significa esofagectomía, lo que requiere anestesia general, tiene riesgo de morbilidad y pérdida de función y desfiguración. La PDT se está viendo como una opción atractiva debido a la gran área que puede tratarse superficialmente con menos riesgo. Photofrin™, ALA y Foscan™ han producido buenas respuestas en estos tipos de cánceres en ensayo clínico (Tabla 3). Las reapariciones en la pared torácica de cáncer de mama se han tratado con éxito con Foscan™ [54] y Photofrin™ [55].

Tabla 3 Resultados clínicos con PDT en cáncer (adaptado de [34,35])

Enfermedad	Fotosensibilizador	Resultado
Cáncer de mucosa de Barrett	Porfímero sódico	Conversión del 75 % a epitelio normal y tumores eliminados
Cáncer de esófago de Barrett	ALA sistémico	Displasia de alto grado erradicada en todos los pacientes
Cáncer de vejiga	Derivado de hematoporfirina	Respuesta completa del 74 %, 30 % vivos después de 5 años
Cáncer de células basales de piel	ALA Tópico	Respuesta completa del 90 %
Cáncer oral	Dihematoporfirina éter	Respuesta completa del 87 % durante 5-53 meses
Reaparición en pared torácica en cáncer de mama	Dihematoporfirina éter	Respuesta completa del 20 %, respuesta parcial del 45 %

Debido a la fácil accesibilidad a la luz, el tratamiento de enfermedad cutánea tal como cáncer de piel ha producido buenos resultados con fármacos PS sistémicos y tópicos (Tabla 3). Las lesiones de cabeza, cuello y orales también han producido buenos resultados y son apropiadas debido al buen resultado cosmético del tratamiento (Tabla 3). Se está ensayando el tratamiento de otros cánceres a medida que se realizan avances en la tecnología de suministro de láser y luz. Pueden usarse endoscopias para suministrar la dosis de luz activadora a cualquier estructura hueca tal como el esófago y la cavidad bronquial, expandiendo de este modo el rango del tratamiento a cánceres gastrointestinales y de pulmón (Tabla 3) con cirugía mínima. Pueden tratarse grandes áreas tales como la pleura y el peritoneo, cuando la radioterapia no sea capaz de proporcionar una dosis curativa suficientemente alta. La PDT es muy prometedora en el tratamiento de estos cánceres serosos superficiales, en combinación con cirugía citorreductora. Puede suministrarse luz a estas superficies grandes en un tiempo corto, a través de cavidades huecas. La profundidad de actividad limitada sería una ventaja ya que se evitarían órganos críticos subyacentes (Tabla 3). La terapia de adyuvantes también es una opción que se está investigando, en la que el tumor sólido se retira quirúrgicamente y cualquier célula tumoral restante se destruye por un ciclo de PDT en la cavidad formada.

Aunque los cánceres de superficie pueden ser los más susceptibles a PDT, puede que los tumores sólidos puedan someterse a tratamiento intersticial, en el que se administra fármaco PS por vía sistémica o mediante inyección intratumoral, seguido de la inserción de fibras de láser mediante agujas distribuidas uniformemente por todo el tumor. Esto puede dar como resultado necrosis de tumores muy grandes [56,57] (Tabla 3).

Por lo tanto, hay varias ventajas de la terapia de PDT. Ofrece tratamientos no invasivos, de baja toxicidad que pueden dirigirse por la activación de luz. Las células diana no pueden desarrollar resistencia a las especies citotóxicas (ROS). Despues del tratamiento, existe poca cicatrización tisular. Sin embargo, los fármacos PS no son muy selectivos para las células diana con relaciones de diana:sangre normalmente de una única cifra en el mejor de los casos. En muchas situaciones esta falta de selectividad conduce a daño inaceptable a los tejidos normales próximos, por ejemplo Photofrin™ [58, 59] en cánceres esofágicos [60, 61], cáncer de vejiga [62]. Debido a que los fármacos PS "se montan sobre" proteínas de la sangre, persisten más tiempo en la circulación de lo que se desea, dejando al paciente fotosensible durante 2 semanas en el mejor de los casos.

A diferencia de los productos quimioterapéuticos convencionales, los fármacos fotosensibilizadores aún pueden estar activos y funcionales estando unidos a vehículos ya que el efecto citotóxico es un efecto secundario resultante de la activación por luz. Esto los hace susceptibles de mecanismos de suministro farmacológico específicos que implican conjugación con moléculas de dirección. En la actualidad, el enfoque preferido para unir fármacos fotosensibilizadores con elementos dirigibles es la conjugación directa de fármacos fotosensibilizadores derivatizados con anticuerpos monoclonales completos. Los anticuerpos completos tienen un peso molecular de 150 KDa, lo que da como resultado fotoimmunoconjungados muy grandes con farmacocinética desfavorable, tal como bajas relaciones de tumor:órgano (2:1) [63,64] que se tarda mucho tiempo en conseguir. La bibliografía actual sugiere que los fármacos fotosensibilizadores unidos a restos en un anticuerpo monoclonal pueden tener un efecto perjudicial entre sí, produciéndose efectos interruptores debido a malas propiedades espectroscópicas [65]. Además de esto, se ha mostrado que se ve una escasa, y poco fiable, carga de fotosensibilizante en el anticuerpo siendo típicas relaciones de 4:1 antes de que el anticuerpo se agregue o pierda función [63-69].

El acoplamiento de fotosensibilizadores se ha intentado usando diversas estrategias con diversos anticuerpos monoclonales. Por ejemplo se ha acoplado PPa con anticuerpos monoclonales anti Her 2. Para conseguir buenas relaciones de acoplamiento de sensibilizante: anticuerpo (en la región de 10:1) hubo que hacer al anticuerpo más soluble uniendo cadenas de polietilenglicol [68]. Esta PEGilación tendría un efecto perjudicial en la farmacocinética del conjugado dando como resultado relaciones de tumor:sangre peores. Además, también se vio aquí la unión no covalente del fotosensibilizante con el anticuerpo. Dicha unión no covalente ha sido una característica de la mayoría

de los intentos presentados de producir conjugados de anticuerpo-fotosensibilizadores, y representa un problema importante en la producción fiable de conjugados bien caracterizados. En un estudio adicional, se usó un sensibilizador de porfirina con anticuerpos monoclonales 17.1A, FSP77 y 35A7 usando un método de acoplamiento de isotiocianato dando como resultado relación de sensibilizadores: anticuerpo no mejor de 2,8:1 [67]. Otro ejemplo fue

5 la verteporfina (derivado de benzoporfidirina, BPD) con anticuerpo monoclonal C225 (anti-EGFR). Aquí, relaciones de acoplamiento de más de 11:1 dieron como resultado baja inmunoreactividad y solubilidad [69]. Las mejores relaciones fueron de aproximadamente 7:1. Estos ejemplos sirven para ilustrar los problemas de producir conjugados bien caracterizados con altas relaciones de fotosensibilizador:anticuerpo, y sugieren que el uso de fragmentos que son de un tercio a un sexto más pequeños que los anticuerpos completos sería aún menos exitoso dada la solubilidad y problemas de carga vistos con la especie proteica más grande.

10 El trabajo sobre fármacos PS unidos con anticuerpos monoclonales ha mostrado que si se unen demasiadas moléculas PS con un anticuerpo monoclonal individual la hidrofobicidad puede verse afectada y puede resultar un efecto adverso en la farmacocinética. Dados los problemas con anticuerpos monoclonales completos, se cree en general que los fragmentos pequeños (tales como scFv, 30 KDa) tendrían eficacias de acoplamiento muy desfavorables, dando como resultado que se acoplen solamente uno o dos fotosensibilizadores. Birchler *et al* [70] intentaron producir un conjugado de fotosensibilizador-ScFv eficaz pero solamente pudieron acoplar un único fotosensibilizador mediante un resto de cisteína específico de sitio con un scFv.

15 20 Otros grupos han intentado evitar estos problemas tratando de unir fármacos PS con "vehículos" diseñados tales como cadenas ramificadas de carbohidratos [71] o polietilenglicol [72] y cadenas de polilisina [73]. Todos estos enfoques requieren etapas de conjugación adicionales ya que los vehículos-ligando no pueden realizarse de forma completamente recombinante. El uso de dichos polímeros también puede tener problemas tales como inestabilidad proteolítica *in vivo*. Se sabe que cuando se unen fotosensibilizadores de esta manera, se autoinactivan, destruyendo 25 sus propiedades fotofísicas y se basan en la degradación de lisozimas para "desinactivarse" antes de que puedan hacerse fotosensibilizadores activos [71]. Por lo tanto, pueden conseguirse relaciones de acoplamiento mayores, hasta 10:1, pero solamente con menor fototoxicidad y menor producción de oxígeno singlete que el fotosensibilizador libre. Los estudios de Roder *et al.* [71] mostraron que la actividad fotosensibilizadora de feoforbitas cuando se une covalentemente en grandes números en torno a la periferia de un dendrímero se redujo 30 drásticamente. Esto es un resultado de los procesos de transferencia de energía, principalmente transferencia de energía de Forster entre colorantes. La transferencia de Forster depende de la distancia y desciende rápidamente con la distancia. La interacción de las moléculas colorantes conduce a cambios en el espectro absorción, tiempos de vida de fluorescencia reducidos y rendimientos cuánticos de oxígeno singlete. También se han descrito por el grupo 35 de los inventores proteínas de fusión que combinan un fragmento de anticuerpo con una molécula vehículo proteica [74].

40 Glickman *et al* [75,76] describen PDT dirigida por anticuerpos monoclonales contra la diana de vasculatura VEGF para enfermedad ocular. Esta usa condiciones de acoplamiento convencionales sin descripción de relaciones de anticuerpo: fotosensibilizador. Sin embargo, Hasan *et al* [77] desvela un sistema de dos disolventes para mejorar las 45 relaciones de acoplamiento de fotosensibilizador: anticuerpo. Aquí, usando concentraciones muy altas de disolventes orgánicos (normalmente 40-60 %) mezclados con tampones acuosos, se han presentado relaciones de hasta 11:1. Sin embargo, las altas concentraciones de disolvente usado probablemente no se toleren por todos los anticuerpos. No se hace mención del uso de fragmentos, pero dada su mayor sensibilidad a disolventes orgánicos, no se esperaría que fueran viables en este método. Además, en Hasan *et al* [77], el gran número de 50 fotosensibilizadores acoplados es autointerruptor, por lo tanto este sistema se basa en la internalización y degradación lisosómica para liberar moléculas fototóxicas. No se espera que los fotoinmunoconjungados unidos a la superficie celular se expongan a enzimas de degradación como las halladas en lisosomas intracelulares. Esto puede excluir la dirección de抗ígenos bajos/no internalizantes tales como CEA y抗ígenos de matriz/del estroma.

55 60 Uniendo fármacos PS nuevos o establecidos con proteínas vehículo pequeñas, dirigibles, es posible suministrar una dosis altamente específica de fármaco PS a un tejido diana, que puede después activarse por luz. Estos conjugados de fármaco PS-vehículo tienen ventajas sobre enfoques de PDT dirigida y no dirigida existentes porque puede acumularse una mayor cantidad de fármaco PS en el tejido diana, con relaciones de tejido y sangre/órgano normal de 20:1 o mejor, en intervalos de tiempo más cortos. Adicionalmente, estos agentes podrían tener ventajas sobre otras estrategias dirigibles con poca o ninguna inmunogenicidad y efectos secundarios menores. Se han usado ligandos menores para suministrar fotosensibilizadores tales como insulina [78], transferrina [79,80], albúmina [81], anexinas [82], toxinas [83], estrógeno [84], derivados de rodamina [85], folato [86] y factores de crecimiento tales como EGF [87] y VEGF [88]. Ninguno de estos ejemplos o cualquier otra cosa en la bibliografía actual proponen que dichos ligandos puedan obtenerse por ingeniería genética mediante evolución proteica o mutagénesis racional para mejorar o potenciar los fotosensibilizadores unidos a ellos.

Sumario de la invención

65 La presente invención proporciona un método para acoplar fotosensibilizadores con proteínas de dirección biológica tales como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo scFv) usando condiciones de acoplamiento previamente desconocidas y optimizadas para asegurar que el vehículo permanezca funcional y soluble. Los conjugados

preferentemente poseen una relación molar alta y uniforme de fotosensibilizadores unidos covalentemente sin unión no covalente. La invención también proporciona conjugados de fotosensibilizador-anticuerpo recombinante obtenido por ingeniería genética con propiedades fotofísicas y fotodinámicas optimizadas, y métodos para producirlos. Además, la invención proporciona formas de acoplar otras moléculas "no fotosensibilizadoras" que potencian las propiedades fotofísicas y fotodinámicas del conjugado global.

Los inventores describen compuestos preparados por un proceso que produce conjugados de terapia fotodinámica dirigida potente, muy eficaz basándose en fragmentos de anticuerpo recombinante pequeños, acoplados químicamente con moléculas fotosensibilizadoras y otras moléculas moduladoras. El uso de dichas moléculas moduladoras puede alterar el mecanismo de generación de especies de oxígeno reactivas dando como resultado más especies de tipo I (radicales libres y superóxidos) que ROS de tipo II. Esto tiene implicaciones importantes para la PDT debido a que cuando se dirigen抗原os sin internalización o con internalización baja tales como proteínas de la matriz, se internaliza poco o nada del fotosensibilizador, lo que significa que la especie que pueda dañar membranas de superficie celular más eficazmente será más potente que los generadores de oxígeno singlete de tipo II. Además, pueden ser preferibles抗原os sin internalización de dirección en algunos casos, particularmente si las células cancerosas han desarrollado alguna forma de resistencia farmacológica a especies de oxígeno reactivas, por ejemplo en la regulación positiva de enzimas de eliminación de ROS (por ejemplo superóxido dismutasa).

La naturaleza biológica de los anticuerpos requiere que se mantengan en tampones principalmente acuosos para conservar la función e integridad. Sin embargo, los fotosensibilizadores tienden a ser de naturaleza hidrófoba y son escasamente solubles en las condiciones de tampón normalmente usadas para anticuerpos. El acoplamiento de un fotosensibilizador con un anticuerpo en condiciones acuosas dará como resultado relaciones de fotosensibilizador: anticuerpo bajas y en disolventes dará como resultado proteínas de anticuerpo dañadas. Los inventores describen un método que utiliza una combinación de disolventes orgánicos a concentración baja.

Los inventores han desarrollado un protocolo de conjugación robusto que puede acoplar eficazmente varios fotosensibilizadores con fragmentos de anticuerpo minimizando al mismo tiempo la unión no covalente.

La naturaleza hidrófoba y altamente adsorbente de la mayoría de los fotosensibilizadores y la naturaleza soluble en agua de los anticuerpos y otras biomoléculas ha hecho la química de conjugación difícil y lo que es más importante ha hecho casi imposible la retirada de impurezas fotosensibilizadoras no conjugadas de dichas conjugaciones. Estos problemas se superaron, sorprendentemente, usando (a) fotosensibilizadores monofuncionales muy puros que permiten a los inventores usar relaciones de acoplamiento relativamente bajas entre anticuerpo y fotosensibilizador, y (b) usando la combinación de 2 disolventes apróticos con un componente acuoso que puede ser agua, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier otra solución de tamponamiento aproximadamente neutra conocida en la técnica.

En un primer aspecto de la invención se proporciona un proceso para preparar un compuesto que comprende un agente fotosensibilizador acoplado con una molécula vehículo que comprende las etapas de:

- 40 (i) proporcionar un agente fotosensibilizador;
- (ii) proporcionar una molécula vehículo;
- (iii) conjugar el agente fotosensibilizador y la molécula vehículo en presencia de un primer y un segundo disolvente aprótico polar y un tampón acuoso;

45 siendo el método como se describe en la reivindicación 1.

Preferentemente, el compuesto comprende una relación de agente fotosensibilizador y molécula vehículo de al menos 3:1. Más preferentemente, las propiedades funcionales y físicas del agente fotosensibilizador y la molécula vehículo sustancialmente no se alteran después del acoplamiento.

50 Los disolventes apróticos polares apropiados de los que se seleccionan el primer y segundo disolvente aprótico polar son del grupo que consiste en: dimetil sulfóxido (DMSO); acetonitrilo; N,N-dimetilformamida (DMF); HMPA; dioxano; tetrahidrofurano (THF); disulfuro de carbono; glima y diglima; 2-butanona (MEK); sulfolano; nitrometano; N-metilpirrolidona; piridina; y acetona. Otros disolventes apróticos polares que pueden usarse se conocen bien por los expertos en la materia. La cantidad total de ambos disolventes apróticos polares en relación con la mezcla acuosa debería ser de aproximadamente 50 % en volumen. Las cantidades relativas de los 2 disolventes apróticos polares entre sí pueden variar de 1 a 49 %: 49 % a 1.

60 Preferentemente, el primer y segundo disolventes apróticos se seleccionan del grupo que consiste en: DMSO; DMF; y acetonitrilo. Más preferentemente, el primer y segundo disolvente aprótico son DMF y acetonitrilo.

Aún más preferentemente, la relación de tampón acuoso y primer disolvente aprótico y segundo disolvente aprótico es aproximadamente 50 %: 1 a 49 %: 49 a 1 %.

La mezcla de disolvente aprótico puede ser de 92 % PBS: 2 % DMSO: 6 % acetonitrilo y la etapa de conjugar el agente fotosensibilizador y la molécula vehículo se realiza a una temperatura entre 0 °C y 5 °C. La combinación de disolventes mantiene la reacción completa homogénea especialmente a estas temperaturas bajas y llevando a cabo el acoplamiento durante aproximadamente solamente 30 minutos, los inventores pudieron conseguir relaciones de acoplamiento altas y grados muy bajos de unión no covalente.

La invención proporciona además un proceso en el que la molécula vehículo es un fragmento de anticuerpo y/o un derivado del mismo. Preferentemente, el fragmento de anticuerpo y/o derivado es un anticuerpo monocatenario, y puede de manera conveniente ser un ScFv. La molécula vehículo es preferentemente humanizada o humana.

Usando el protocolo anterior, pueden acoplarse fotosensibilizadores con grupos de ácido carboxílico derivatizados para formar ésteres activos eficazmente y con relación molar alta con fragmentos de anticuerpo mediante restos de lisina accesibles en superficie. La pirofeoforbida a (PPA) es un fotosensibilizador derivado de productos naturales, y aparte de excelente fotofísica que lo hace un fotosensibilizador ideal, posee una única cadena lateral de ácido propiónico. La función del ácido propiónico de PPA puede convertirse fácilmente en el N-hidroxisuccinimida éster (NHS) correspondiente o "éster activo" y purificarse mediante una combinación de cromatografía y recristalización para obtener derivados muy puros listos para conjugación, y a continuación acoplarse eficazmente con fragmentos de anticuerpo.

Preferentemente, el agente fotosensibilizador es un fotosensibilizador monofuncional. Más preferentemente, el grupo fotosensibilizador es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: hematoporfirinas, Photofrin™, porfirinas de origen natural, clorinas y bacterioclorinas, feoforbidas como pirofeoforbida a y sus derivados como fotocloro, clorinas, clorina e6, derivado de mono-1-aspartilo de clorina e6, derivado de di-1-aspartilo de clorina e6, clorina de estaño (IV) e6, los derivados de paladio de bacterioclorofilas de origen natural como TOOKAD (Pd-bacteriofeoforbida), clorinas y bacterioclorinas sintéticas como metatetrahidrofenil clorina (Foscan) y bacterioclorina, derivados de benzoporfirina, derivados de monobenzoporfirina como verteporfina, ftalocianinas, ftalocianinas de aluminio sulfonadas (disulfonadas y tetrasulfonadas), naftalocianinas de aluminio sulfonadas y derivados, purpurinas como purpurina 18, derivados de estaño y cinc de octaetylpurpurina, etiopurpurina de estaño, verdinas, porfisenos, porfirinas sintéticas, clorinas y bacterioclorinas, como las mesotrietinilporfirinas (documento WO2004/046151) tanto sin metales como metalizadas, porfirinas de núcleo modificado (documento WO2004/076461), porfirinas expandidas (texafirinas) como motexafina de lutecio y motexafina de gadolinio.

También pueden usarse compuestos no porfilínicos como fotosensibilizadores e incluyen derivados de fenotiazinio como azul de metileno, azul de toluidina, cianinas tales como merocianina 540, colorantes de acridina, colorantes de BODIPY y derivados de aza-BODIPY, hipericina, colorantes de escuarina halogenada y colorantes de xanteno halogenado como eosina y rosa Bengal.

Otros fotosensibilizadores adecuados para conjugación con fragmentos de anticuerpo se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la materia. Sin embargo, la presencia de múltiples funcionalidades reactivas en el fotosensibilizador puede conducir a varios problemas. Es difícil obtener material suficientemente puro para controlar la estequiometría de la reacción de conjugación y como consecuencia se llevan a cabo reacciones usando grandes excesos del fotosensibilizador reactivo dando como resultado unión no covalente aumentada. También puede producirse entrecruzamiento de anticuerpos intramoleculares durante la conjugación dando como resultado rendimientos de acoplamiento bajos y aumento de la formación de agregados.

El trabajo de los inventores con los fragmentos de anticuerpo ha mostrado que controlar la estequiometría del fotosensibilizador durante la conjugación y tener restos de lisina suficientemente separados geométricamente puede conducir a fotoimmunoconjungados con cargas de fotosensibilizador altas y excelente actividad PDT.

Convenientemente, el proceso comprende además la siguiente etapa realizada después de la etapa (iii):

(iv) acoplar un agente modulador con la molécula vehículo, en el que el agente modulador es capaz de modular la función del agente fotosensibilizador.

Además de acoplar fotosensibilizadores a ligandos, también es posible, usando química de acoplamiento similar acoplar otras moléculas con los ligandos de tal modo que modifiquen las propiedades fotofísicas o fotodinámicas del fotoimmunoconjungado general. Estas moléculas alternativas pueden acoplarse con el mismo tipo de resto que los fotosensibilizadores (es decir antes o después del acoplamiento de fotosensibilizador) a relaciones estequiométricas para permitir que ambos tipos de moléculas se acoplen/acomoden o en diferentes tipos de restos (por ejemplo fotosensibilizador acoplado en lisinas y posteriormente producto químico modificador acoplado con restos de aspartato/glutamato).

Los moduladores fotodinámicos pueden actuar para alterar los tipos y cantidades de especies reactivas de oxígeno generadas tras iluminación del fotosensibilizador. Por ejemplo pueden modularse fotosensibilizadores que generan una reacción más de tipo II (es decir oxígeno singlete) para generar más reacción de tipo I con altas concentraciones de radicales de superóxido e hidróxido. Esto podría tener implicaciones importantes en la potencia de la PDT o

resultado terapéutico. Por ejemplo, un fotoinmunoconjuguado que se dirija a un antígeno tumoral no internalizante puede ser más potente si generara una reacción predominantemente de tipo I en la superficie de la célula, provocando daño de membrana y siendo menos susceptible a respuestas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (que se genera de forma intracelular).

5 Preferentemente, el agente modulador se selecciona del grupo que consiste en: ácido benzoico; derivados de ácido benzoico que contienen un grupo azida como ácido 4-azidotetrafluorofenilbenzoico y otros grupos aromáticos o heteroaromáticos que contienen un resto de azida (N_3) incluyendo polifluorobencenos, naftalinas, naftaquinonas, antracenos, antraquinonas, fenantrenos, tetracenos, naftacendionas, piridinas, quinolinas, isoquinolinas, indoles, isoindoles, pirroles, imidazoles, pirazoles, pirazinas, benzimidazoles, benzofuranos, dibenzofuranos, carbazoles, acridinas, acridonas y fenantridinas, xantinas, xantonas, flavonas y cumarinas. Los sulfenatos aromáticos y heteroaromáticos derivaron de los grupos aromáticos/heteroaromáticos anteriores. Otros agentes moduladores específicos incluyen análogos de vitamina E como Trolox, butil hidroxi tolueno, propil galato, ácido desoxicólico y ácido ursadesoxicólico. Un ejemplo de un modificador químico que puede acoplarse con un ligando junto con el agente fotosensibilizador es el succinimidil éster de ácido benzoico (BA).

Se ha mostrado que esto da como resultado destrucción de células por PDT más potente *in vitro* cuando se acopla conjuntamente con PPa con un scFv anti CEA en comparación con el scFv acoplado con PPa solamente.

20 Preferentemente, el proceso comprende además la siguiente etapa realizada después de la etapa (iii) o (iv):

(v) combinar el compuesto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una formulación farmacéutica.

25 El proceso de la invención también puede incluir la etapa opcional de acoplar un agente de visualización con el conjugado. Como alternativa el agente fotosensibilizador que forma parte del conjugado también puede usarse como un agente de visualización.

30 El uso de anticuerpos recombinantes en inmunoensayos o diagnóstico es un área bien estudiada. La especificidad exquisita, alta afinidad y versatilidad de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo los hace moléculas de unión ideales como parte de un sistema de detección. Por ejemplo, en la captura de imágenes médica, se han unido anticuerpos con compuestos ópticamente activos tales como colorantes fluorescentes y se usan para detectar lesiones precancerosas y cancerosas, midiendo la respuesta a tratamiento y detección temprana de reapariciones [95] y se han detectado *in vitro*, encefalopatías espongiformes transmisibles (enfermedades priónicas) con anticuerpos marcados con fluorescencia [96].

35 La captura de imágenes tumorales clínicamente útiles requieren la detección de lesiones pequeñas. Los beneficios de la detección pueden después realizarse por acción temprana. Uno de los problemas asociados con las técnicas de captura de imágenes convencionales es el escaso contraste entre el tumor y el fondo. Se han desarrollado diversas estrategias para aumentar la localización de moléculas de dirección en tumores y para reducir su captación por tejido normal, mejorando de este modo la relación de tumor: tejido. Estos enfoques incluyen desarrollar moléculas peptídicas específicas de tumor pequeño con farmacocinética favorable [97], técnicas de marcaje mejoradas [98], uso de estrategias predirección, modificación del suministro tumoral y en regulación positiva de expresión de marcador tumoral. Además, se han desarrollado varios colorantes nuevos [99]. Se han sintetizado fluorocromos de rojo lejano que tienen muchas propiedades deseables para captura de imágenes *in vivo*. Los fluorocromos de rojo lejano absorben y emiten a longitudes de onda a las que la sangre y el tejido son relativamente transparentes, tienen altos rendimientos cuánticos, y tienen buena solubilidad incluso a relaciones molares superiores de fluorocromo y anticuerpo. Las especies de anticuerpos pequeñas tales como fragmentos Fv de cadena sencilla poseen farmacocinética que puede dar como resultado buenas relaciones de contraste, pero se eliminan rápidamente dando como resultado niveles absolutos bajos de grupos indicadores en el tejido diana. Los mayores rendimientos fluorescentes pueden compensar esta deposición inferior aumentando la sensibilidad de la detección.

40 Otras aplicaciones de captura de imágenes incluyen el desarrollo de herramientas de investigación. Los anticuerpos marcados con colorantes han sido muy valiosos en la visualización de procesos biológicos celulares tales como tráfico de receptores [100]. Los rendimientos fluorescentes aumentados permitirían la detección y control de moléculas de baja abundancia. El método habitual para visualizar células marcadas es microscopía inmunofluorescente en la que pueden controlarse simultáneamente moléculas de marcaje múltiple usando una serie de anticuerpos específicos que poseen diferentes espectros de emisión de fluorescencia no solapantes.

45 Como se ha descrito anteriormente, el acoplamiento de moléculas colorantes con fragmentos de anticuerpo u otros ligandos apropiados usando las condiciones de acoplamiento nuevas de los inventores dan como resultado relaciones de carga mayores. Esto se puede traducir directamente en fotofísica potenciada. Además de la mayor generación de oxígeno singlete para PDT potenciada, la fotofísica superior puede manifestarse como fluorescencia aumentada. Los fotoinmunoconjungados de fragmentos de anticuerpo con moléculas colorantes apropiadas pueden ser reactivos de diagnóstico más eficaces debido a su farmacocinética favorable y fluorescencia potenciada. La

rápida eliminación y baja unión tisular no específica conducirán a relaciones de contraste muy altas y la alta fluorescencia permitirá una detección más sensible de la señal de salida. El uso de fragmentos de anticuerpo, construidos, seleccionados o modificados por ingeniería genética para contener grupos funcionales separados de forma favorable para acoplamiento (por ejemplo, grupos amino de lisina) como se ha descrito anteriormente puede conducir a colorantes con rendimientos de fluorescencia más favorables debido a inactivación e interacciones erróneas reducidos. Esto tendrá aplicaciones principalmente en la captura de imágenes médica, pero también puede usarse para hacer reactivos más sensibles para kits de diagnóstico o captura de imágenes celulares y acoplando colorantes fluorescentes y fotosensibilizadores a los mismos fragmentos de anticuerpo puede producirse un agente bifuncional, permitiendo tanto la formación de imágenes tumorales como la fototerapia.

En un segundo aspecto de la invención se proporciona un compuesto que comprende un agente fotosensibilizador acoplado con una molécula vehículo que puede obtenerse por el proceso de la invención.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto que comprende un agente fotosensibilizador acoplado con una molécula vehículo con una relación de acoplamiento mínima de 3:1 en el que la molécula vehículo se une selectivamente con una célula diana, como se describe en la reivindicación 19.

Preferentemente la molécula vehículo tiene un límite de tamaño superior de 3:1 en comparación con el fotosensibilizador, normalmente un límite superior de 30 kDa. Un ejemplo de dicho vehículo es un scFv.

Provechosamente las propiedades funcionales y físicas del agente fotosensibilizador y la molécula vehículo están sustancialmente inalteradas en la forma acoplada en comparación con las propiedades cuando están en una forma no acoplada.

Preferentemente, la molécula vehículo se selecciona del grupo que consiste en: un fragmento de anticuerpo y/o un derivado del mismo, o un ligando peptídico no inmunogénico.

Convenientemente el fragmento de anticuerpo y/o derivado del mismo es un fragmento de anticuerpo monocatenario, en particular un scFv.

Como alternativa la molécula vehículo es humanizada o humana.

Convenientemente el agente fotosensibilizador es un fotosensibilizador monofuncional. Preferentemente, el agente fotosensibilizador es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: hematoporfirinas, PhotofrinTM, porfirinas de origen natural, clorinas y bacterioclorinas, feoforbas como pirofeoforba a y sus derivados como fotocloro, clorinas, (por ejemplo, clorina e6), derivado de mono-1-aspartilo de clorina e6, derivado de di-1-aspartilo de clorina e6, clorina de estaño (IV) e6, los derivados de paladio de bacterioclorofilas de origen natural como TOOKAD (Pd-bacteriofeoforba), clorinas y bacterioclorinas sintéticas como metatetrahidroxifenil clorina (Foscan) y bacterioclorina, derivados de benzoporfirina, derivados de monobenzoporfirina como verteporfina, ftalocianinas, ftalocianinas de aluminio sulfonadas (disulfonadas y tetrasulfonadas), naftalocianinas de aluminio sulfonadas y derivados, purpurinas como purpurina 18, derivados de estaño y cinc de octaetylpurpurina, etiopurpurina de estaño, verdinas, porfiscenos, porfirinas sintéticas, clorinas y bacterioclorinas, como las mesotriethylporfirinas, porfirinas de núcleo modificado sin metales y metalizadas, porfirinas expandidas (texafirinas) como motexafina de lutecio y motexafina de gadolinio y compuestos no porfirínicos tales como derivados de fenotiazinio como azul de metileno, azul de toluidina, cianinas tales como merocianina 540, colorantes de acridina, colorantes de BODIPY y derivados de aza-BODIPY, hipericina, colorantes de escuarina halogenada y colorantes de xanteno halogenado como eosina y rosa Bengal.

De manera conveniente el agente fotosensibilizador se acopla con la molécula vehículo en un resto de aminoácido o una molécula de azúcar en la molécula vehículo.

Preferentemente el resto de aminoácido es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: lisina; cisteína; tirosina; serina; glutamato; aspartato; y arginina. Como alternativa, la molécula de azúcar se selecciona de al menos una del grupo que consiste en: azúcares que comprenden un grupo hidroxilo; azúcares que comprenden un grupo aldehído; azúcares que comprenden un grupo amino; y azúcares que comprenden un grupo de ácido carboxílico.

Aunque el acoplamiento de fotosensibilizadores con restos de lisina es generalmente sencillo, la metodología de conjugación anterior también puede aplicarse al acoplamiento de fotosensibilizadores con fragmentos de anticuerpo mediante otros restos de aminoácidos o moléculas de azúcar unidas con la proteína por glucosilación ligada a N u O usando diferentes grupos funcionales en los restos fotosensibilizadores. La Tabla 4 enumera estos restos y las otras posibles químicas de acoplamiento que pueden usarse con este método de acoplamiento.

Tabla 4 Grupos funcionales para acoplar fotosensibilizadores en anticuerpos

Resto o restos	Grupo funcional	Química de acoplamiento	Enlace resultante
Lisina	Amina	Éster activo Isotiocianato Isocianatos Acil azidas Sulfonil cloruro Carbonilo, reducido Epóxido Carbonatos Derivados de fluorobenceno Imidoésteres Carbodiimidas Anhídridos	Amida Isotiourea Isourea Amida Sulfonamida Base de Schiff, 2 ^a amina 2 ^a Amina Carbamato Arilamina Amidina Amida Amida
Cisteína	Tiol	Haloacetilo Maleimidas Acriloílo	Tioéter Tioéster Tioéster
	Activada	Derivado de arilo activado Éster activo Carbodiimida Reacciones Redox	Ariltioéter Tioéster Tioéster Disulfuro
Tirosina, serina	Hidroxilo	Diazonio Mannich Éster activo Alquilación Activa Isocianatos	Diazo 2 ^a amina Éster Éter Carbamato
Glutamato, aspartato	Ácido carboxílico	Diazoalquilo Carbodiimidas Acilimidazol	Éster Amida, Éster, Tioéster Amida, Éster, Tioéster
Arginina	Guanidinilo	Dicarbonilo	Base de Schiff
Azúcares	Hidroxilo (por ejemplo glucosa)	Acilación Alquilación Escisión oxidativa al aldehído	Éster Éter Base de Schiff, reducción suave a la 2 ^a amina
Azúcares	Aldehído (por ejemplo manosa)	Aminación reductora	Base de Schiff, 2 ^a amina
Azúcares	Amino (por ejemplo, b-D-manosamina)	Véase reacciones para lisina	Véase reacciones para lisina
Azúcares	Ácido carboxílico (por ejemplo ácido siálico)	Véase reacciones para glutamato	Véase reacciones para glutamato

Los fragmentos de anticuerpo varían en su secuencia de aminoácidos y el número y separación de los grupos funcionales para acoplarse con fotosensibilizadores. El grupo funcional más frecuentemente usado para conjugación es la amina primaria hallada en el extremo N terminal y en restos de lisina como se ha descrito anteriormente. Los inventores han descubierto, sorprendentemente, que un determinante principal de la eficacia de un conjugado de fragmento de anticuerpo-fotosensibilizador particular es la separación espacial de los restos con los que se unen las moléculas fotosensibilizadoras. Estos restos deben ser distintos y estar topológicamente separados en la superficie del anticuerpo para acoplamiento eficaz y fotofísica óptima del conjugado resultante.

Generalmente, las proteínas se pliegan para formar un núcleo hidrófobo en el centro de la molécula con una superficie hidrófila que permite la solubilidad en disolventes fisiológicos. Se encuentran habitualmente en la superficie de proteínas restos básicos tales como lisinas y argininas, restos ácidos tales como glutamatos y aspartatos, restos polares tales como serinas (y en ocasiones tirosinas), cisteínas, glutaminas y asparaginas. En

5 muchos ejemplos estos restos están implicados en el mantenimiento de la estructura y función de esa proteína.

En el ejemplo de fragmentos de anticuerpo tales como Fv monocatenario cada dominio está compuesto de un dominio pesado variable (VH) y ligero variable (VL). Estos pueden ser uno de cualquier familia de dominios VH y VL. Un alineamiento de las familias de genes VH y VL (Figura 1) muestra que, generalmente, muchos restos pueden tolerarse en cualquier posición. En el caso de los bucles de unión a antígeno (regiones determinantes de complementariedad, CDR), estas secuencias son específicas de la capacidad de ese anticuerpo para reconocer su antígeno afín. Estos pueden manipularse para alterar la especificidad o afinidad del anticuerpo pero no por otras razones. La mayor parte de la secuencia de dominio es la región marco conservada. La Figura 1 indica qué áreas tienden a estar presentes en la superficie del anticuerpo y qué áreas tienden a ser interiores como parte del núcleo.

10

15 Dado el alto grado de homología estructural y secuencial entre anticuerpos, estas regiones pueden aplicarse generalmente a todas las secuencias de anticuerpo. Las regiones marco conservadas de superficie tienden a contener los restos cargados o polares, distribuidos uniformemente (es decir sin requisitos particulares en ninguna posición particular).

20 Tomando los restos de lisina como ejemplo, estos se encuentran habitualmente en la superficie de dominios de anticuerpo. En el caso de miembros de la familia VH1 humana de línea germinal, hay 5-6 restos de lisina, solamente uno o dos de los cuales están cerca entre sí. Una definición de un resto que está cerca de otro puede ser uno que está adyacente en la secuencia primaria, por lo tanto adyacente en la estructura tridimensional. Como alternativa, un resto puede estar separado de acuerdo con la secuencia primaria, pero adyacente en el espacio debido a la estructura del pliegue del dominio de anticuerpo. Un resto directamente adyacente puede definirse como a 3-4 ángstrom de distancia en el espacio.

25 Los inventores han descubierto que el acoplamiento de los fotosensibilizadores en restos de lisina que están directamente adyacentes dará como resultado inactivación fotofísica y peores efectos fotodinámicos (tales como agregación aumentada y menor solubilidad de los fotoimmunoconjungados). El acoplamiento es más eficaz cuando los restos de lisina están más separados, preferentemente a dos aminoácidos de distancia (de 3,5 a 7,5 ángstrom), más preferentemente a tres aminoácidos de distancia (de 9 a 12 ángstrom), más preferentemente a cuatro aminoácidos de distancia (10-15 ángstrom), aún más preferentemente a cinco aminoácidos de distancia (15-20 ángstrom), aún más preferentemente a seis aminoácidos de distancia (20-25 ángstrom). Los anticuerpos deberían elegirse, seleccionarse o modificarse por ingeniería genética para poseer estas propiedades. Cuantos más restos de lisina posea un anticuerpo, con más separación óptima, mejor será ese anticuerpo en la formación de fotoimmunoconjungados eficaces y potentes con efectos fotofísicos y fotodinámicos óptimos.

30 Se conocen bien en la técnica métodos para determinar si los restos de aminoácidos para acoplamiento de fotosensibilizador están cerca o adyacentes entre sí. El alineamiento de secuencias Clustal (usando recursos web tales como <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> Instituto de bioinformática Europeo) es una herramienta bien establecida para comparar secuencias de aminoácidos primarias. Además, en ausencia de datos estructurales tridimensionales completos para un fragmento de anticuerpo, es posible usar técnicas bien establecidas tales como formación de modelos de homología usando estructuras conocidas (por ejemplo la de un scFv murino [89] para deducir la estructura probable del fragmento de anticuerpo, y para identificar de este modo si los restos para acoplamiento están cerca o adyacentes en el espacio. El alto grado de homología mostrado por anticuerpos y fragmentos de anticuerpo significa que estas técnicas pueden aplicarse con un alto grado de confianza. Están disponibles recursos web para formación de modelos de homología, tales como el Sistema de Análisis de Bioinformática Expert del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://us.expasy.org>) que también proporciona el programa de modelado de escritorio gratuito SwissPDB Viewer.

35 40 45 50 55 60

Un ejemplo de dicha distribución favorable de restos de lisina en un scFv se muestra en la Figura 2 (un scFv derivado de VH1-VK3 humano). Si la distribución de restos de lisina es menos favorable para conjugación y fotofísica óptima, el fragmento de anticuerpo puede alterarse usando técnicas de biología molecular convencionales, tales como mutagénesis dirigida para retirar restos poco separados (situados muy cerca) o introducir restos bien separados.

El concepto anterior también puede aplicarse a la separación y acoplamiento con otros restos de aminoácidos distintos de lisina o con moléculas de azúcar unidas con la proteína por glucosilación ligada a N u O. La Tabla 4 enumera estos restos y la posible química de acoplamiento que puede usarse.

65

El concepto anteriormente también puede aplicarse a ligandos no basados en anticuerpo. Se enumeran ejemplos de ligandos que pueden usarse para dirigir fotosensibilizadores que también pueden verse influidos por la separación de aminoácidos en la Tabla 5.

Tabla 5

Lista de ligandos basados en anticuerpo y no basados en anticuerpo que pueden usarse en terapia fotodinámica dirigida		
Tipo	Nombre de ligando	Referencia
Basado en inmunoglobulina	Anticuerpos de dominio	30
	Fv monocatenarios	70
	Fragmento Fab	90
	Dominios Fn3	29
	Proteína L	91
	Receptores de linfocitos T	92
No inmunoglobulina	Péptidos	88
	Repeticiones de anquirina	32
	Anticalina	31

5 Esto conducirá a fotosensibilizadores acoplados que conservan sus propiedades fotofísicas y por lo tanto buena función de terapia fotodinámica. Hay muchos ejemplos de anticuerpos en los que muchos de los restos de lisina están adyacentes en secuencia primaria o en espacio tridimensional. Por modelado molecular y mutagénesis dirigida, los inventores pudieron obtener por ingeniería genética la posición de estos restos de lisina, añadiendo adicionales si hay muy pocos, retirando restos adyacentes o aumentando la distancia entre otros.

10 Esto conduce a fragmentos de anticuerpo que son más susceptibles de acoplamiento a fotosensibilizador, capaces de conseguir mayor carga (relaciones de fotosensibilizador: anticuerpo aumentadas) y efectos de PDT más potentes. Una medición indirecta de la fotofísica potenciada es la fluorescencia aumentada.

15 Provechosamente el compuesto comprende además un agente modulador en el que el agente modulador es capaz de modular la función del agente fotosensibilizador acoplado con la molécula vehículo. Preferentemente el agente modulador se selecciona del grupo de ácido benzoico, derivados de ácido benzoico que contienen un grupo azida como ácido 4-acidotetrafluorofenilbenzoico y otros grupos aromáticos o heteroaromáticos que contienen un resto de azida (N_3) incluyendo polifluorobencenos, naftalinas, naftaquinonas, antracenos, antraquinonas, fenantrenos, tetracenos, naftacendionas, piridinas, quinolinas, isoquinolinas, indoles, isoindoles, pirroles, imidazoles, pirazoles, pirazinas, benzimidazoles, benzofuranos, dibenzofuranos, carbazoles, acridinas, acridonas y fenantridinas, xantinas, xantonas, flavonas y cumarinas. Los sulfenatos aromáticos y heteroaromáticos derivaron de los grupos aromáticos/heteroaromáticos anteriores. Otros agentes moduladores específicos incluyen análogos de vitamina E como Trolox, butil hidroxilotolueno, propil galato, ácido desoxicólico y ácido ursadesoxicólico.

20 Convenientemente, el compuesto comprende además un agente de visualización, por ejemplo un colorante fluorescente o luminiscente (véase anteriormente).

25 Son ejemplos preferidos de conjugados:

- (a) en los que la molécula vehículo es un ScFv y el agente fotosensibilizador es Pirofeoforbida a.
- 30 (b) en los que la molécula vehículo es un ScFv y el agente fotosensibilizador es monoácido de derivado de benzoporfirina (Verteporfina, VisudyneTM)
- (c) en los que la molécula vehículo es un ScFv y el agente fotosensibilizador es bacteriofeoforbida de paladio (TOOKADTM).
- 35 (d) en los que la molécula vehículo es un ScFv y el agente fotosensibilizador es derivado de mono-1-aspartilo de clorina e6.
- 40 (e) en los que la molécula vehículo es un ScFv y el agente fotosensibilizador es meta-tetrahidroxifenil clorina (FoscanTM)
- (f) en los que la molécula vehículo es un ScFv y el agente fotosensibilizador es etioporpurina de estaño (rostaporfina).

En un cuarto aspecto de la invención se proporciona un compuesto del tercer aspecto para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad que requiera la destrucción de una célula diana.

5 También se proporciona el uso del compuesto en la fabricación de un medicamento para el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de una enfermedad que requiera la destrucción de una célula diana.

10 Preferentemente, la enfermedad para tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer; degeneración macular relacionada con la edad; trastornos inmunitarios; enfermedad cardiovascular; e infecciones microbianas incluyendo infecciones virales, bacterianas o fúngicas, enfermedades priónicas tales como BSE y enfermedades orales/dentales tales como gingivitis.

15 Más preferentemente la enfermedad para tratar es cáncer de colon, pulmón, mama, cabeza y cuello, próstata, piel, estómago/gastrointestinal, vejiga y lesiones precancerosas tales como esófago de Barrett.

20 Convenientemente el diagnóstico de enfermedades se realiza por visualización del agente fotosensibilizador o un agente de visualización opcional tal como un colorante fluorescente o luminiscente.

Provechosamente el compuesto o composición se administra a un paciente antes de la exposición a la luz.

25 En un quinto aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende el compuesto de la invención y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Significados de los términos usados

30 25 Se entenderá que la expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a uno cualquiera de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o derivado de anticuerpo. Se pretende que abarque anticuerpos de tipo silvestre (es decir una molécula que comprende cuatro cadenas polipeptídicas), anticuerpos sintéticos, anticuerpos recombinantes o híbridos de anticuerpos, tales como una molécula de anticuerpo modificada monocatenaria producida por presentación de fagos de regiones variables y/o constantes de cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina, u otra molécula inmunointeractiva capaz de unirse con un antígeno en un formato de inmunoensayo que se conoce por los expertos en la materia.

35 35 La expresión "derivado de anticuerpo" se refiere a cualquier molécula de anticuerpo modificada que sea capaz de unirse con un antígeno en un formato de inmunoensayo que se conozca por los expertos en la materia, tal como un fragmento de un anticuerpo (por ejemplo fragmento Fab o Fv), o una molécula de anticuerpo modificada que se modifica por la adición de uno o más aminoácidos u otras moléculas para facilitar el acoplamiento de los anticuerpos con otro péptido o polipéptido, con una proteína vehículo grande o con un soporte sólido (por ejemplo los aminoácidos tirosina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína y derivados de los mismos, grupos de NH₂-acetilo o grupos de amido COOH terminales, entre otros).

40 40 La expresión "molécula de ScFv" se refiere a cualquier molécula en la que los dominios compañeros V_H y V_L estén unidos mediante un oligopéptido flexible.

45 45 Las expresiones "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico", "polinucleótido" u "oligonucleótido" se usan de forma intercambiable y se refieren a un heteropolímero de nucleótidos o la secuencia de estos nucleótidos. Estas frases también se refieren a ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario y puede representar la cadena con sentido o antisentido, a ácido péptido nucleico (PNA) o a cualquier material de tipo ADN o tipo ARN. En las secuencias del presente documento A es adenina, C es citosina, T es timina, G es guanina y N es A, C, G o T (U). Se contempla que cuando el polinucleótido sea ARN, la T (timina) en las secuencias proporcionadas en el presente documento se sustituye con U (uracilo). Generalmente, los segmentos de ácido nucleico proporcionados por la presente invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos del genoma y enlazadores oligonucleotídicos cortos, o de una serie de oligonucleótidos, o de nucleótidos individuales, para proporcionar un ácido nucleico sintético que es capaz de expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos reguladores derivados de un operón microbiano o viral, o un gen eucariota.

55 55 Las expresiones "polipéptido" o "péptido" o "secuencia de aminoácidos" se refieren a una secuencia de oligopéptido, péptido, polipéptido o proteína o fragmento de la misma y a moléculas de origen natural o sintéticas. Un "fragmento", "parte" o "segmento" polipeptídico es un tramo de restos de aminoácidos de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente 7 aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 9 aminoácidos y más preferentemente al menos aproximadamente 17 o más aminoácidos. Para ser activo, cualquier polipéptido debe tener suficiente longitud para presentar actividad biológica y/o inmunológica.

60 65 Las expresiones "purificado" o "sustancialmente purificado" como se usan en este documento indican que el ácido nucleico o polipéptido indicado está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, por ejemplo, polinucleótidos, proteínas. En una realización, el polinucleótido o polipéptido se purifica de modo que constituya al menos el 95 % en peso, más preferentemente al menos el 99 % en peso, de las macromoléculas

biológicas indicadas presentes (pero pueden estar presentes agua, tampones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tengan un peso molecular de menos de 1000 dalton).

- 5 El término "aislado" como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico o polipéptido separado de al menos otro componente (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) presente con el ácido nucleico o polipéptido en su fuente natural. En una realización, el ácido nucleico o polipéptido se encuentra en presencia de (si lo hubiera) solamente un disolvente, tampón, ión u otro componente normalmente presente en una solución del mismo. Los términos "aislado" y "purificado" no abarcan ácidos nucleicos o polipéptidos presentes en su fuente natural.
- 10 El término "recombinante", cuando se usa en el presente documento para referirse a un polipéptido o proteína, significa que un polipéptido o proteína deriva de sistemas de expresión recombinantes (por ejemplo, microbiano, de insectos o de mamífero). "Microbiano" se refiere a polipéptidos o proteínas recombinantes realizados en sistemas de expresión bacterianos o fúngicos (por ejemplo, de levadura). Como producto, "microbiano recombinante" define un polipéptido o proteína esencialmente sin sustancias endógenas nativas y no acompañado de glucosilación nativa asociada. Los polipéptidos o proteínas expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos, por ejemplo, *E. coli*, estarán sin modificaciones de glucosilación; los polipéptido o proteínas expresados en levadura tendrán un patrón de glucosilación en general diferente de los expresados en células de mamífero.
- 15 La expresión "vector de expresión" se refiere a un plásmido, fago, virus o vector, para expresar un polipéptido de una secuencia de ADN (ARN). Un vehículo de expresión puede comprender una unidad transcripcional que comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores y con frecuencia potenciadores, (2) una secuencia estructura o codificante que se transcribe a ARNm y se traduce a proteína y (3) secuencias de inicio y terminación de la transcripción y la traducción apropiadas. Las unidades estructurales que se pretende usar en sistemas de expresión de levadura o eucariotas preferentemente incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de proteína traducida por una célula hospedadora. Como alternativa, cuando se exprese proteína recombinante sin una secuencia líder o de transporte, esta puede incluir un resto de metionina amino terminal. Este resto puede escindirse o no posteriormente a partir de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.
- 20 30 Las expresiones "unión selectiva" y "selectividad de unión" indican que las regiones variables de los anticuerpos de la invención reconocen y se unen con polipéptidos de la invención exclusivamente (es decir, capaces de distinguir el polipéptido de la invención de otros polipéptidos similares a pesar de identidad de secuencia, homología o similitud halladas en la familia de polipéptidos), pero también pueden interaccionar con otras proteínas (por ejemplo, proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas de ELISA) mediante interacciones con secuencias fuera de la región variable de los anticuerpos, y en particular, en la región constante de la molécula. Se conocen bien y se practican de forma rutinaria en la técnica ensayos de exploración para determinar la selectividad de unión de un anticuerpo de la invención. Para un análisis exhaustivo de dichos ensayos, véase Harlow *et al.* (Eds), Antibodies A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N. Y. (1988), Capítulo 6. También se contemplan anticuerpos que reconocen y se unen con fragmentos de los polipéptidos de la invención, siempre que los anticuerpos sean en primer lugar y principalmente selectivos para, como se ha definido anteriormente, polipéptidos de longitud completa de la invención. Como con anticuerpos que son selectivos para polipéptidos de longitud completa de la invención, los anticuerpos de la invención que reconocen fragmentos son los que pueden distinguir polipéptidos de la misma familia de polipéptidos a pesar de identidad, homología o similitud de secuencia inherente hallada en la familia de proteínas.
- 25 35 40 45 La expresión "afinidad de unión" incluye el significado de la fuerza de unión entre una molécula de anticuerpo y un antígeno.
- 50 La expresión "reacción de acoplamiento" significa el número de moléculas de agente fotosensibilizador acoplado con una molécula vehículo.
- 55 La expresión "molécula vehículo" incluye el significado de cualquier agente con el que se acople el agente fotosensibilizador. En particular, la molécula vehículo puede ser un compuesto pequeño incluyendo fragmentos de anticuerpo y péptidos no inmunogénicos.
- 60 La expresión "fotosensibilizador monofuncional" o "agente fotosensibilizador monofuncional" significa un fotosensibilizador como PPA que contiene una única cadena lateral de ácido propiónico que puede activarse y acoplarse o mediante el uso de química conocida en la técnica un sensibilizador puede modificarse mediante química de protección/desprotección para poseer un grupo que puede activarse/acoplarse.
- La expresión "disolvente aprótico" significa un disolvente que no tiene grupos OH y por lo tanto no puede donar un enlace de hidrógeno.

Realizaciones preferidas

Se describirán ahora ejemplos que incorporan ciertos aspectos preferidos de la invención con referencia a las siguientes figuras en las que:

5 **Figura 1** - Alineamiento de genes variables de inmunoglobulina humana, con restos de lisina destacados en negrita. Ciertas familias tales como VH-1 humano contienen más restos de lisina y favorablemente separados lo que hace los scFv (u otros formatos de anticuerpo) derivados de ellos más eficaces para el acoplamiento de fotosensibilizador. FR=marco conservado, CDR=regiones determinantes de complementariedad.

10 **Figura 2** - Representación estructural de un scFv de la familia de VH1-VK3 humana con restos de lisina de origen natural destacados en negro. Los restos de lisina se sitúan favorablemente para acoplamiento de fotosensibilizador eficaz y buena fotofísica.

15 **Figura 3** - Clonación de un scFv en un sistema de expresión pET

20 **Figura 4** - Purificación de C6.5 por cromatografía de afinidad metálica inmovilizada (IMAC) usando resina cargada con cloruro de níquel. C6.5 se eluyó de la columna usando imidazol 250 mM. El carril 4 muestra C6 eluido de la columna y concentrado 5 veces usando una columna de centrifugación.

25 **Figura 5** - Preparación de PPa succinimidil éster

30 **Figura 6** - Perfil de absorbancia de scFv de C6.5 conjugado con PPa (línea en negrita) y PPa libre (línea fina), en tampón de PBS. Los picos de absorbancia se usan para determinar la relación de PPA: scFv como se describe en los ejemplos.

35 **Figura 7** - Perfil de absorbancia de scFv MFE-23 conjugado con PPa y PPa/ácido benzoico (Ba) y PPa libre, en tampón de PBS. Los picos de absorbancia se usan para determinar la relación de PPA: scFv como se describe en los ejemplos.

40 **Figura 8** - Preparación de PB1 succinimidil éster

45 **Figura 9** - Perfil de absorbancia de scFv HuBC-1 conjugado con PPa. Los picos de absorbancia se usan para determinar la relación PPA: scFv como se describe en los ejemplos. La mala estructura de HuBC-1 da como resultado malas propiedades de absorbancia del conjugado scFv-PPa en comparación con scFv C6.5.

50 **Figura 10** - Perfil de absorbancia de scFv C6.5 acoplado con fotosensibilizadores Pirofeoforbida a y Clorina e6

55 **Figura 11** - Perfiles de fluorescencia de diversas concentraciones de conjugado de scFv C6.5-PPa y PPa libre medidos en tampón de PBS. La PPa libre no emite fluorescencia significativamente en tampones acuosos, pero cuando se conjuga con un scFv conserva buenas propiedades fotofísicas.

60 **Figura 12** - Perfiles de fluorescencia de diversas concentraciones de conjugados scFv C6.5-PPa, scFv MFE-23-PPa y scFv NFE-23-PPa/Ba (ácido benzoico) medidos en tampón de PBS. La PPa libre no emite fluorescencia de forma significativa en tampones acuosos (Figura 7), pero cuando se conjuga con un scFv conserva buenas propiedades fotofísicas. El scFv C6.5 es mejor en la conservación de fluorescencia (por lo tanto la fotofísica que incluye generación de oxígeno singlete) que el scFv MFE-23.

65 **Figura 13** - ELISA de antígeno CEA de scFv MFE-23, scFv MFE-23-PPa y scFv MFE-23-PPa/Ba. Se observa una pequeña reducción de la afinidad de unión tras el acoplamiento.

70 **Figura 14** - Destrucción celular por PDT *in vitro* de scFv C6.5-PPa en células positivas para antígeno (SKOV-3) y células negativas para antígeno (LS174T).

75 **Figura 15** - Destrucción celular por PDT *in vitro* de scFv C6.5-PPa en células positivas para antígeno (LS174T) y células negativas para antígeno (SKOV-3).

80 **Figura 16** - Relaciones de tumor: sangre *in vivo* de scFv C6.5 en comparación con el conjugado C6.5-PPa después de 24 horas en un modelo de xenoinjerto de tumor humano SKOV-3 (superior) y porcentaje de captación de tumor después de 24 horas (inferior)

85 **Figura 17** - Farmacocinética *in vivo* (perfles de eliminación de la sangre) de scFv y conjugados scFv=PPa en ratones desnudos

90 **Figura 18** - La terapia de PDT *in vivo* de ratones desnudos portadores de tumores da como resultado necrosis de un tumor con xenoinjerto de SKOV-3 humano. Panel izquierdo, C6.5 solo más luz, panel derecho, C6.5-PPa

más luz

Figura 19 - El alineamiento de un scFv de "PDT" óptimo tal como C6.5 (un scFv VH1-VK3) con HuBC-1 revela cambios que pueden realizarse por mutagénesis. Se realizan estos 6 cambios que pueden dar como resultado un scFv HuBC-1 (BC-1-mut) con propiedades de acoplamiento a fotosensibilizador más favorables. Estos cambios son K13Q, Q43K, T87K, R152K, R180K y G210K.

Figura 20 - Células SKOV3 marcadas con C6.5scFV-PPa permiten la visualización sensible del receptor de Her-2 que se ve que se internaliza de forma eficaz.

Figura 21 - Espectro de emisión de PPa de células SKOV-3.

Figura 22 - Espectro de absorbancia de PPa y fotoimmunoconjungados de scFv-PPa (A) PPa (14 mg/ml) en PBS/DMSO 1,9 % [1] y DMSO 100 % [2]. (B) 50 mg/ml de C6.5-PPa (C) 10 mg/ml de cada uno de MFE-PPa de material congelado [1] y material nuevo [2]. (D) Un panel de fotoimmunoconjungados de scFv-PPa alternativos todos a 10 mg/ml, D1.3 [1], F1 [2], GP6 [3] y HuBC-1 [4].

Figura 23 - Citotoxicidad *in vitro* de fotoimmunoconjungados C6.5-PPa y MFE-PPa (A) LoVo (e), SKOV3 (○) expuesto a PPa libre (B) C6.5-PPa expuesto a células SKOV3 (●) y células LoVo (○) (C) scFv MFE (material nuevo)-PPa expuesto a células LoVo (●), scFv MFE (material congelado)-PPa expuesto a células LoVo (○), scFv MFE (material nuevo)-PPa expuesto a células SKOV3 (▼)

Figura 24 - Microscopia inmunofluorescente de células KB negativas para antígeno de fotoimmunoconjungado C6.5-PPa (A-D) o células SKOV3 positivas para antígeno (E-J) se incubaron con PPa libre o fotoimmunoconjungado C6.5-PPa durante 1 hora. Se registraron las imágenes y los espectros de emisión.

Figura 25 - Análisis *in vivo* de PIC C6.5-PPa

(a) Farmacocinética en sangre-la fracción restante en la sangre durante un periodo de 24 horas se midió con respecto a anticuerpos, PPa y fotoimmunoconjungados. IgG completa (○), PPa libre (●), C6.5-PPa (Δ), MFE-PPa (▼), scFv C6.5 libre (□), scFv MFE libre (■)

(b) Biodistribución del PIC scFv C6.5-PPa en ratones desnudos portadores de tumores a las 8 horas (barras negras) y 24 horas (barras grises). La relación tumor: sangre a las 24 horas se eligió como un buen valor para realizar el estudio de terapia.

(c) Dos conjuntos de ratones desnudos portadores de tumores SKOV3 se trataron con solución salina-PBS (●) y 40 mg de fotoimmunoconjungado C6.5-PPa (○) seguido de iluminación con láser. El progreso del crecimiento tumoral se registró durante los siguientes 25 días. Se vio retardo del crecimiento significativo ($p=0,0075$).

Figura 26 - Alineamiento de aminoácidos de scFv. Los dominios pesado variable-enlazador-ligero variable se muestran con restos de lisina destacados en negrita para ilustrar la variabilidad en el número y posición que pueden influir en la eficacia de acoplamiento de PDT y potencia de fotoimmunoconjungado.

Figura 27 - Preparación de Verteporfina (VisudyneTM) succinimidil éster

Figura 28 - Perfiles de absorbancia de diversas concentraciones de conjugado de scFv C6.5-Verteporfina (VisudyneTM) y Verteporfina libre (VisudyneTM) medidos en tampón de PBS.

Figura 29 - Destrucción celular por PDT *in vitro* de conjugado de scFv C6.5-Verteporfina (VisudyneTM) y Verteporfina libre (VisudyneTM) en células negativas para antígeno (KB) y células positivas para antígeno (SKOV-3). Se determinó el porcentaje de supervivencia celular (%) para:

- conjugado de scFv C6.5-Verteporfina (VisudyneTM) en células SKOV3 (●);
- Verteporfina libre (VisudyneTM) en células SKOV3 (○);
- conjugado de scFv C6.5-Verteporfina (VisudyneTM) en células KB (▼);
- Verteporfina libre (VisudyneTM) en células KB (Δ).

60 **Materiales**

Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Reino Unido a no ser que se indique. PPa fue de Frontier Scientific, Reino Unido, scFv C6.5 fue un regalo del Profesor Marks (Universidad de California, San Francisco, Estados Unidos), scFv MFE-23 fue un regalo del Doctor Chester (Royal Free Hospital, Escuela Universitaria de Londres, Reino Unido), scFv HuBC-1 fue un regalo de Antisoma Research Ltd (Londres, Reino Unido). Los reactivos de biología molecular y bacterias fueron de Stratagene, las líneas celulares humanas fueron de

ECACC, Reino Unido, los medios de cromatografía fueron de Amersham Biosciences, Reino Unido, los ratones fueron de Harlan, Reino Unido, las fuentes de Luz fueron de Phototherapeutics, Reino Unido y High Powered Devices, Nueva Jersey, Estados Unidos.

5 **Ejemplo 1 - Preparación de un scFv anti Her 2**

1. Se amplificó por PCR un scFv anti cáncer, elegido, bien caracterizado, por ejemplo c6.5 (anti Her2) y se clonó como un fragmento Nco I/Not I en el vector de expresión bacteriana (por ejemplo pET20b, Novagen) para crear pETC6.SscFv (Figura 3).
- 10 2. El vector pETC6.5scFv se transformó en *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) por el método de cloruro cárlico (Sambrook *et al*, 1990) y se sembró en placas de agar 2TY que contenían ampicilina 100 mg/ml (Sambrook *et al*, 1990). Se seleccionaron transformantes de colonias individuales y se volvieron a sembrar en estrías en placas de Agar 2TY nuevas que contenían ampicilina.
- 15 3. Se seleccionó una colonia individual y se cultivó en 5 ml de medio 2TY que contenía ampicilina 100 mg/ml a 30 °C, en un incubador con agitación (250 rpm) durante 8-16 horas. Este cultivo se usó después para inocular un cultivo de 500 ml de medio 2TY que contenía ampicilina 100 mg/ml y se cultivó en condiciones similares durante 3-16 horas adicionales.
- 20 4. El sobrenadante de cultivo se recogió y se concentró usando una celda agitada de ultrafiltración Amicon con una membrana de punto de corte de 30 KDa hasta un volumen final de 10 ml. Como alternativa, el periplasma bacteriano puede prepararse usando el método de choque osmótico con sacarosa en un volumen de 10 ml.
- 25 5. El sobrenadante concentrado o extracto periplásмico se dializó durante 16 horas frente a 5 l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía NaCl 0,5 M y MgCl₂ 2 mM. Este se aplicó después a una columna de sepharose quelante cargada con cobre (II) o níquel (II) (Amersham-Pharmacia Biotech) y se purificó por cromatografía de afinidad metálica inmovilizada (IMAC) por ejemplo como se describe en [14]. La proteína recombinante se eluyó en un gradiente de imidazol a imidazol entre 40 y 150 mM (Figura 4).
6. La proteína de fusión eluida se purifica adicionalmente por filtración en gel en una columna de superdex-75 (Amersham-Pharmacia Biotech) equilibrada en PBS. La proteína resultante se denomina scFv c6.5.

30 **Ejemplo 2 - Preparación de PPa succinimidil éster (Figura 5)**

1. A una solución protegida de la luz de la pirofeoforbida a (50 mg, 0,094 mmol) en una mezcla de DCM seco/THF (9:1) se añadió N-hidroxisuccinimida (12,9 mg, 0,11 mmol) seguido de diciclohexilcarbodiimida (DCC) (23,2 mg, 0,11 mmol).
- 35 2. Despues de agitar durante 12 horas, la diciclohexilurea precipitada se separó por filtrado y se retiraron los disolventes. El producto en bruto se captó en un volumen pequeño de cloroformo y se precipitó por la adición de hexano. Se recogió el precipitado, se lavó bien con hexano y se purificó el producto en bruto resultante por cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con hexano 2 % en etil acetato (*R*_f 0,66).
3. El producto aislado se volvió a cristalizar a partir de DCM/hexano para proporcionar pirofeoforbida a succinimidil éster puro (1) en un rendimiento del 70 %. MS (FAB⁺) 631 (M⁺, 100%)
- 40 4. Una solución de reserva de scFv C6.5 a 500 µl/ml se descongeló a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl a 706 µl de PBS. Se añadió acetonitrilo (60 µl) a la solución. La solución se agitó en hielo hasta que se enfrió.

45 **Ejemplo 3 - Conjugación de scFv c6.5 con PPa - sistema de disolvente 1**

1. Se añadió después pirofeoforbida a succinimidil éster compuesta en DMSO 100% (34 µl) a partir de una solución de reserva de 1,58 mM al scFv C6.5 con agitación continua (para proporcionar 16 equivalentes de PPa). La mezcla se mantuvo en hielo y en oscuridad, agitando durante 30 minutos, después de lo cual la solución se situó en tubos de diáisisis y se dializó frente a 5 l de PBS a 4 °C durante una noche en oscuridad.
- 50 2. Cada muestra del conjugado se colocó en una cubeta de cuarzo y se procesó un perfil de absorbancia frente a un blanco que contenía PBS (Figura 6). Se midió el valor de absorbancia a 410 nm y se determinó la concentración de PS en g/ml comparando con una curva patrón de PPa.
3. Por ejemplo, si la concentración de PPa hallada en las reacciones de acoplamiento fue de 0,0000159 g/ml. El número de moléculas de PPa en 0,0000159 g/ml fue de 1,4 x 10¹⁶. El número de moléculas de C6 en 100 µg/ml fue de 2 x 10¹⁵. La relación de PPa:C6.5 fue por lo tanto de 8:1.

55 **Ejemplo 4 - Conjugación de scFv MFE-23 (anti CEA) con PPa - sistema de disolvente 2**

1. Una solución de reserva de MFE-23 a 500 µg/ml se descongeló a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl a 706 µl de PBS. Se añadió acetonitrilo (60 µl) a la solución. La solución se agitó en hielo hasta que se enfrió.
- 60 2. Se añadió después pirofeoforbida a succinimidil éster (34 µl) a partir de una solución de reserva de DMSO 1,58 mM al MFE-23 con agitación continua (para proporcionar 16 equivalentes de PPa). La mezcla se mantuvo en hielo y en oscuridad, con agitación durante 30 minutos, después de lo cual la solución se situó en tubos de diáisisis y se dializó frente a 5 l de PBS a 4 °C durante una noche en oscuridad.
- 65 3. Cada muestra del conjugado se situó en una cubeta de cuarzo y se procesó un perfil de absorbancia frente a un blanco que contenía PBS (Figura 7). Se midió el valor de absorbancia a 410 nm y se determinó la

concentración de PS en g/ml comparando con una curva patrón de PPA. Por ejemplo, si la concentración de PPa hallada en la reacciones de acoplamiento fue de 0,0000129 g/ml. El número de moléculas de PPa en 0,0000129 g/ml fue de $1,4 \times 10^{16}$. El número de moléculas de MFE en 100 µg/ml fue de 2×10^{15} . La relación de PPa:MFE-23 fue por lo tanto de 6:1

- 5
- Ejemplo 5 - Preparación de PB1 succinimidil éster (Figura 8)**
- 10 1. A una solución protegida de la luz del derivado de ácido benzoico de PB1 (20 mg, 0,01136 mmol) en THF anhídrido, se añadió N-hidroxisuccinimida (2 mg, 0,017 mmol) seguido de diciclohexilcarbodiimida (DCC) (3,5 mg, 0,017 mmol). Después de agitar durante 12 horas, la diciclohexilurea precipitada se separó por filtrado y se retiraron los disolventes. El producto en bruto resultante se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con THF (R_f 0,79) para proporcionar el compuesto deseado (2) como un sólido verde oscuro en rendimiento del 65 %. MS (FAB^+) 1860 ($M+2$, 80%).

15 **Ejemplo 6 - Conjugación de scFv c6.5 con PB1 - sistema de disolvente 1**

- 20 1. Se descongeló una solución de reserva de C6.5 a 500 µg/ml a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl a 706 µl de PBS. Se añadió acetonitrilo (60 µl) a la solución. La solución se agitó en hielo hasta que se enfrió.
2. Después se añadió PB1 (véase [94]) compuesto en DMSO 100 % (34 µl) a partir de una solución de reserva de 1,58 mM al C6.5 con agitación continua (para proporcionar 16 equivalentes de PB1). La mezcla se mantuvo en hielo y en oscuridad, con agitación durante 30 minutos, después de lo cual se situó la solución en tubos de diálsis y se dializó frente a 5 l de PBS a 4 °C durante una noche en oscuridad.
- 25 3. Análisis de conjugados. Cada muestra del conjugado se colocó en una cubeta de cuarzo y se procesó un perfil de absorbancia frente a un blanco que contenía PBS. Se midió el valor de absorbancia a 460 nm y se determinó la concentración de PS en g/ml comparando con una curva patrón de PB1.

Ejemplo 7 - Acoplamiento de modulador de BA con un scFv en un conjugado de scFv PPa

- 30 1. Se descongeló una solución de reserva de MFE-23 a 500 µg/ml a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl a 690,8 µl de PBS. Se añadió acetonitrilo (60 µl) a la solución.
2. La solución se agitó y se añadieron 15,2 µl de solución del benzoílo succinimidil éster 0,491 µM (preparado por la reacción de ácido benzoico con N-hidroxisuccinimida y DCC en diclorometano seco), disuelto en DMSO (para proporcionar 16 equivalentes de ácido benzoico). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual el matraz se enfrió en hielo con agitación continua.
- 35 3. Después se añadió pirofeoforbida a succinimidil éster compuesto en DMSO 100 % (34 µl) a partir de una solución de reserva de 1,58 mM (para proporcionar 16 equivalentes de PPa). La mezcla se mantuvo en hielo y en oscuridad, con agitación durante 30 minutos, después de lo cual la solución se colocó en tubos de diálsis y se dializó frente a 5 l de PBS a 4 °C durante una noche en oscuridad.
- 40 4. Cada muestra del conjugado se colocó en una cubeta de cuarzo y se procesó un perfil de absorbancia frente a un blanco que contenía PBS (Figura 7). Se midió el valor de absorbancia a 410 nm y se determinó la concentración de PS en g/ml comparando con una curva patrón de PPa. Por ejemplo, si la concentración de PPa hallada en la reacciones de acoplamiento fue de 0,0000129 g/ml. El número de moléculas de PPa en 0,0000129 g/ml fue de $1,4 \times 10^{16}$. El número de moléculas de MFE en 100 µg/ml fue de 2×10^{15} . La relación de PPa:MFE-23 fue por lo tanto de 6:1

45 **Ejemplo 8 - Conjugación de scFv HuBC-1 con PPa (un mal scFv para PDT)**

- 50 1. A una solución protegida de la luz de la pirofeoforbida a (50 mg, 0,094 mmol) en una mezcla de DCM/THF (9:1) seco se añadió N-hidroxisuccinimida (12,9 mg, 0,11 mmol) seguido de diciclohexilcarbodiimida (DCC) (23,2 mg, 0,11 mmol).
2. Después de agitar durante 12 horas, la diciclohexilurea precipitada se separó por filtrado y se retiraron los disolventes. El producto en bruto se captó en un volumen pequeño de cloroformo y se precipitó mediante la adición de hexano. El precipitado se recogió, se lavó bien con hexano y el producto en bruto resultante se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con hexano 2 % en etil acetato (R_f 0,66).
- 55 3. El producto aislado se recristalizó a partir de DCM/hexano para proporcionar pirofeoforbida a succinimidil éster puro (1) en un rendimiento del 70 %. MS (FAB^+) 631 (M^+ , 100%)
4. Se descongeló una solución de reserva de scFv HuBC-1 a 500 µl/ml a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl a 706 µl de PBS. Se añadió acetonitrilo (60 µl) a la solución. La solución se agitó en hielo hasta que se enfrió.
- 60 5. Después se añadió pirofeoforbida a succinimidil éster compuesto en DMSO 100 % (34 µl) a partir de una solución de reserva de 158 mM al scFv HuBC-1 con agitación continua (para proporcionar 16 equivalentes de PPa). La mezcla se mantuvo en hielo y en oscuridad, con agitación durante 30 minutos, después de lo cual la solución se situó en tubos de diálsis y se dializó frente a 5 l de PBS a 4 °C durante una noche en oscuridad.
- 65 6. Cada muestra del conjugado se situó en una cubeta de cuarzo y se procesó un perfil de absorbancia frente a un blanco que contenía PBS (Figura 9). Se midió el valor de absorbancia a 410 nm y se determinó la

concentración de PS en g/ml comparando con una curva patrón de PPa.

7. El pico de absorbancia bajo a 410 nm significa que no fue posible determinar el grado de acoplamiento con PPa.

5 **Ejemplo 9 - Conjugación de scFv C6.5 con clorina (e6)**

1. A una solución protegida de la luz de clorina e6 (0,00184 mmol) en DMF anhídrido se añadieron cantidades equimolares tanto de N-hidroxisuccinimida como de dicitohexil carbodiimida y la mezcla se agitó durante 12 horas con argón.
- 10 2. La mezcla resultante se enfrió brevemente en agua helada y después se filtró para retirar el producto secundario de dicitohexil urea y se evaporó hasta sequedad para proporcionar clorina e6 succinimidil éster como un sólido verde oscuro.
- 15 3. Se descongeló una solución de reserva de scFv C6.5 a 500 µg/ml a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl a 706 µl de PBS. Se añadió acetonitrilo (60 µl) a la solución. La solución se agitó en hielo hasta que se enfrió.
- 20 4. Se añadió después clorina e6 succinimidil éster compuesto en DMSO 100 % (34 µl) a partir de una solución de reserva de 1,58 mM al scFv C6.5 con agitación continua (para proporcionar 16 equivalentes de Ce6). La mezcla se mantuvo en hielo y en oscuridad, con agitación durante 30 minutos, después de lo cual la solución se situó en tubos de diáisisis y se dializó frente a 5 l de PBS a 4 °C durante una noche en oscuridad.
- 25 5. Cada muestra del conjugado se colocó en una cubeta de cuarzo y se procesó un perfil de absorbancia frente a un blanco que contenía PBS (Figura 10). Se midió el valor de absorbancia a 410 nm y se determinó la concentración de PS en g/ml comparando con una curva patrón de Ce6.
6. Por ejemplo, si la concentración de Ce6 hallada en la reacciones de acoplamiento era de 0,000034 g/ml. El número de moléculas de Ce6 en 0,000034 g/ml fue de $3,43 \times 10^{16}$. El número de moléculas de C6 en 100 µg/ml fue de 2×10^{15} . La relación de Ce6:c6.5 fue por lo tanto de 9:1

25 **Ejemplo 10 - Conjugación de scFv C6.5 con un derivado de hidracina de PPa**

1. Preparación del Derivado de Hidracida de PPa. La cadena lateral de ácido propiónico de pirofeoforbida a se convirtió en el acil cloruro por procedimientos convencionales en la bibliografía (oxalil cloruro en DCM). El cloruro ácido se obtuvo como un resto verde pegajoso y se usó sin purificación adicional.
- 30 2. Se añadió una solución de cloruro ácido en DCM anhídrido en gotas a un exceso de hidracina al 98 % en DCM anhídrido, la reacción se controló por TLC y terminó en menos de 1 hora. El disolvente y reactivo en exceso se evaporaron y el resto se purificó por cromatografía. Después se compuso una solución de reserva de la hidracida PPa en DMSO.
- 35 3. Se modificó por ingeniería genética un scFv, por ejemplo C6.5, para poseer cadenas de carbohidratos de la siguiente manera: se usó mutagénesis dirigida para incorporar sitios de glucosilación ligados a N a través de la superficie del scFv, en posiciones que estaban todas bien separadas, de acuerdo con el concepto ya descrito para la separación de restos de lisina. Este clon se situó en un vector de expresión adecuado para una célula hospedadora que puede llevar a cabo glucosilación (por ejemplo, vector pPIC para expresión en levadura *Pichia pastoris*).
- 40 4. El scFv se expresó y purificó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando cromatografía de NTA-Níquel.
- 45 5. La PPa derivatizada se acopló con los restos de aldehído en el scFv glucosilado. El acoplamiento con los restos de aldehído se realizó rápidamente en ambientes tamponados con la formación de un enlace de hidrazona.

Ejemplo 11 - Caracterización fotofísica de un conjugado de scFV-PPa

1. Se realizaron diluciones en serie (concentraciones divididas a la mitad) de los conjugados en PBS y se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 410 nm y una longitud de onda de emisión de 680 nm.
- 50 2. Estos se compararon con PPa libre en PBS. Se muestran ejemplos para scFv c6.5-PPa (Figura 11) y scFv MFE-PPa (+/- ácido benzoico) (Figura 12).

Ejemplo 12 - Caracterización bioquímica de un conjugado de scFV-PPa y scFv PPa/BA

- 55 1. Se llevaron a cabo las características de unión *in vitro* de la molécula de scFv anti CEA-PPa por ELISA (Lane, 1990) o por resonancia de plasmón superficial de BIACore usando métodos publicados Lipschultz *et al.* 'Experimental Design For Analysis of Complex Kinetics Using Surface Plasmon Resonance' Methods (2000) 20, 3180, en comparación con el scFv no modificado. También puede compararse la unión celular del scFv-PPa/BA con las proteínas no modificadas y puede determinarse por Separación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia Confocal.
- 60 2. Como ejemplo, se recubrió una placa de ELISA de 96 pocillos con antígeno carcinoembionario (CEA) 1 µg/ml en PBS y se incubó durante una noche a 4 °C. Al día siguiente la placa se lavó tres veces en PBS-tween 0,1 % y tres veces en PBS.
- 65 3. La placa de ELISA se incubó después en tampón de bloqueo (Marvel™ 10 % en PBS-tween 0,1 %) durante 60

minutos a 37 °C.

4. El tampón de bloqueo se retiró de los pocillos y se le añadieron 50 µl de MFE conjugado o no conjugado diluido en tampón de bloqueo para proporcionar diluciones divididas a la mitad de MFE de $100\text{-}1,9 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ a cada pocillo. La placa se incubó como anteriormente y los pocillos se lavaron como se ha descrito anteriormente.
5. Se añadió anticuerpo primario (50 µl/ml, anti-MFE de conejo; diluido en tampón de bloqueo a 1:40 000) a cada pocillo. La placa se incubó y se lavó como se ha descrito anteriormente.
6. Se añadió anticuerpo secundario (50 µl, conjugado de peroxidasa de rábano rusticano anti conejo; diluido en tampón de bloqueo a 1:10 000) a cada pocillo. Las placas se incubaron y se lavaron como anteriormente. Se añadió azul BM (50 µl) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad, hasta que se desarrolló un color azul.
7. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de ácido clorhídrico 0,5 M. Las muestras se leyeron después a 460 nm (Figura 13).

Ejemplo 13 - Citotoxicidad in vitro de un conjugado de scFv c6.5-PPa

1. La citotoxicidad celular *in vitro* se midió de la siguiente manera: las células diana (en este ejemplo LoVo y LS17T) se mantuvieron a 37 °C, CO₂ 5 % en medio (DMEM) complementado con suero de ternero fetal al 10 % y penicilina/estreptomicina 5 mM en un matraz de 75 cm². Para células SkoV3, el medio usado fue medio 5A de McCoy complementado con FBS 15 %, penicilina/estreptomicina 5 mM.
2. Cuando la confluencia fue del 70-80 %, las células se lavaron en PBS y se añadieron 5 ml de tripsina. El matraz se incubó a 37 °C, CO₂ 5 % durante 15 minutos o hasta que las células se habían separado del matraz. Las células se colocaron después en un tubo Falcon de 50 ml y la tripsina se desactivó añadiendo 15 ml de DMEM o medio de McCoy.
3. Se trajeron células (20 µl) del tubo y se colocaron en un hemocímetro para su recuento. Las células restantes se recogieron a 1800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento se resuspendió suavemente en 1 ml de DMEM o un medio de McCoy. Las células se resuspendieron exhaustivamente y se añadieron 19 ml adicionales de DMEM o medio de McCoy. Las células se diluyeron en DMEM o medio de McCoy en consecuencia para proporcionar 2×10^6 células/ml. Después se añadieron células (50 µl) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubó durante una noche a 37 °C y CO₂ 5 %.
4. Se llevó a cabo el siguiente procedimiento con luz tenue: al día siguiente, el conjugado de diluyó en PBS para proporcionar concentraciones de C6.5 equivalentes a 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 y 0,78 µg/ml. Las células se lavaron una vez con PBS y se añadieron 50 µl del conjugado a pocillos por cuadruplicado. También se incluyeron pocillos de control (pocillos con conjugado añadido pero no expuestos a la luz, y pocillos sin conjugado añadido ni expuestos a la luz). Se determinó en experimentos anteriores que la luz del láser solamente no tenía ningún efecto en la viabilidad celular, de modo que no se incluyeron controles de "solamente luz" a no ser que se cambiara la fuente de luz, o dosis de energía de la luz.
5. Las células se incubaron en el conjugado o PS libre (la concentración varía) durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ 5 % y después se lavaron 3 veces con PBS. Se añadió PBS (50 µl) a cada pocillo y se expusieron pocillos por cuadruplicado a luz de láser durante 2 minutos (dosis de energía = 4,2 J; densidad de energía = 1,4 J/cm²).
6. El PBS se retiró de cada pocillo y se añadieron 100 µl de DMEM o medio de McCoy. Las placas se envolvieron sueltas en papel metalizado, pero se cubrieron adecuadamente de modo que no pudiera entrar ninguna luz ambiental. Las placas se incubaron después como anteriormente durante 48 horas, después de lo cual se llevó a cabo un ensayo de destrucción celular.
7. Se llevaron a cabo ensayos de destrucción celular usando los kits Cytotox-96 (de acuerdo con el protocolo de Promega). Las células se lavaron 3 veces con PBS y se añadieron 50 µl de solución de lisis celular. Las placas se incubaron durante 60 minutos a 37 °C en oscuridad. Después de este tiempo, se añadieron 50 µl de solución de sustrato (lo que indica la cantidad de lactato deshidrogenasa en las células). Esto se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual, se añadieron 50 µl de solución de parada (ácido acético 0,5 M). Las suspensiones celulares se retiraron de los pocillos y se colocaron en una placa de microtitulación nueva. La absorbancia se midió después a 490 nm en un lector de placas de microtitulación.
8. Se determinaron las muertes celulares y se expresaron como un porcentaje de los controles (Figura 14).

Ejemplo 14 - Citotoxicidad in vitro de un conjugado de scFv MFEscFv-PPa/BA

1. La citotoxicidad celular *in vitro* se midió de la siguiente manera: las células diana (en este ejemplo LoVo, LS17T o SkoV3) se mantuvieron a 37 °C, CO₂ 5 % en medio (DMEM) complementado con suero de ternero fetal al 10 % y penicilina/estreptomicina 5 mM en un matraz de 75 cm². Para células SkoV3, el medio usado fue medio 5A de McCoy complementado con FBS 15 %, penicilina/estreptomicina 5 mM.
2. Cuando fueron confluyentes al 70-80 %, las células se lavaron en PBS y se añadieron 5 ml de tripsina. El matraz se incubó a 37 °C, CO₂ 5 % durante 15 minutos o hasta que las células se separaron del matraz. Las células se colocaron después en un tubo Falcon de 50 ml y la tripsina se desactivó añadiendo 15 ml de DMEM o medio de McCoy.
3. Se trajeron células (20 µl) del tubo y se colocaron en un hemocímetro para su recuento. Las células restantes se recogieron a 1800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento se resuspendió suavemente en 1 ml de DMEM o medio de McCoy. Las células se resuspendieron exhaustivamente y se

añadieron 19 ml adicionales de DMEM o McCoy. Las células se diluyeron en DMEM o medio de McCoy en consecuencia para proporcionar 2×10^6 células/ml. Después se añadieron células (50 μl) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubaron durante una noche a 37 °C y CO₂ 5%.

5 4. El siguiente procedimiento se llevó a cabo con luz tenue: al día siguiente, el conjugado se diluyó en PBS para proporcionar concentraciones de MFE equivalentes a 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 y 0,78 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células se lavaron una vez con PBS y se añadieron 50 μl del conjugado a pocillos por cuadruplicado. También se incluyeron pocillos de control (pocillos con conjugado añadido pero no expuestos a la luz, y pocillos sin conjugado añadido ni expuestos a la luz). Se determinó en experimentos previos que la luz del láser por sí sola no tiene ningún efecto en la viabilidad celular, de modo que no se incluyeron controles de "solamente luz" a no ser que se cambiara la fuente de luz, o la dosis de energía de la luz.

10 5. Se incubaron células en el conjugado o PS libre (la concentración varía) durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ 5 % y después se lavaron 3 veces con PBS. Se añadió PBS (50 μl) a cada pocillo y se expusieron pocillos por cuadruplicado a luz de láser durante 2 minutos (dosis de energía = 4,2 J; densidad de energía = 1,4 J/cm²).

15 6. El PBS se retiró de cada pocillo y se añadieron 100 μl de DMEM. Las placas se envolvieron sueltas en papel metalizado, pero se cubrieron de forma adecuada de modo que no entrara luz ambiental. Las placas se incubaron después como anteriormente durante 48 horas, después de lo cual se llevó a cabo un ensayo de destrucción celular.

20 7. Los ensayos de destrucción celular se llevaron a cabo usando los kits Cytotox-96 (de acuerdo con el protocolo de Promega). Las células se lavaron 3 veces con PBS y se añadieron 50 μl de solución de lisis celular. Las placas se incubaron durante 60 minutos a 37 °C en oscuridad. Después de este tiempo, se añadieron 50 μl de solución de sustrato (lo que indica la cantidad de lactato deshidrogenasa en células). Este se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual, se añadieron 50 μl de solución de parada (ácido acético 0,5 M). Las suspensiones celulares se retiraron de los pocillos y se colocaron en una placa de microtitulación nueva. La absorbancia se midió después a 490 nm en un lector de placas de microtitulación.

25 8. Se determinaron las muertes celulares y se expresaron como un porcentaje de los controles (Figura 15).

Ejemplo 15 - Dirección *in vivo* de un conjugado de scFv-PPa

30 1. La erradicación de tumor *in vivo* puede demostrarse de la siguiente manera: se inyectaron aproximadamente 1 $\times 10^7$ células SKOV-3 s.c. en el flanco de un ratón BALB/C desnudo y se permitió que los tumores se establecieran durante 4-6 semanas.

35 2. Se inyectaron de diez a 50 μg de scFv-PPa radiomarcado con yodo 125 (usando el método de Iodogen, Pierce Chemical Co.) i.v. en la vena de la cola de ratones portadores de tumores y se permitió que se acumulara en el tumor durante un periodo de 1-48 horas.

40 3. Se sacrificaron grupos de tres o más ratones de cada punto temporal analizado con anestesia terminal, se diseccionaron y se analizaron el tumor, la sangre y diversos órganos con respecto a captación del scFv-PPa. Se llevaron a cabo experimentos de control con PPa solamente y scFv.

4. Como ejemplo, se muestra la dirección tumoral de c6.5-PPa en comparación con el scFv y PPa solamente en la Figura 16. Se vio que el tiempo de circulación en sangre del fotosensibilizador hidrófobo se reducía después de la unión con una scFv hidrófilo (Figura 17).

Ejemplo 16 - Terapia fotodinámica *in vivo* de un conjugado de scFv-PPa

45 1. Puede demostrarse la erradicación tumoral *in vivo* de la siguiente manera: se inyectaron aproximadamente 1 $\times 10^7$ células SKOV-3 s.c. en el flanco de un ratón BALB/C desnudo y se permitió que los tumores se establecieran durante 4-6 semanas.

50 2. Se inyectan de cincuenta a 200 μg de scFv-PPa i.v. en la vena de la cola de ratones portadores de tumores y se permite que se acumule en el tumor durante un periodo de 12-24 horas.

3. En un momento en el que la relación de tumor: órgano normal es alta (5:1 o mejor, por ejemplo, 16 horas), se irradia luz en los tumores a 2,4 W por cm².

4. El tamaño de los tumores se mide usando calibradores y se compara con ratones tratados solamente con solución salina. Los tumores se observaron con respecto a necrosis inducida por PDT (Figura 18).

Ejemplo 17 - Modificación por ingeniería genética de un scFv (por ejemplo HuBC-1) para tener grupos funcionales optimizados para acoplamiento con fotosensibilizador

55 1. Se analizó un scFv que ha mostrado en la práctica que presenta propiedades fotofísicas muy bajas (tales como fluorescencia, generación de oxígeno singlete y foto-citotoxicidad *in vitro*) al nivel de estructura primaria y estructura terciaria. Esto puede realizarse mediante alineamiento de aminoácidos con un scFv que se sabe que es bueno con respecto a acoplamiento con fotosensibilizadores o examen de la estructura tridimensional.

60 2. Se identifican los restos que se van a usar para acoplar con fotosensibilizadores activados, por ejemplo restos de lisina.

3. Se manipulan algunos que estén adyacentes entre sí, bien en la secuencia primaria o topológicamente de un modelo tridimensional (o estructura real) por mutagénesis dirigida. La alteración puede ser la introducción de un resto de lisina con separación óptima, la retirada de una lisina que está demasiado cerca de otra o el reemplazo

de una lisina no deseada con otro resto similar pero no conjugable (tal como arginina o glutamina).

4. En este ejemplo, el scFv HubC-1 antifibronectina se alineó con c6.5 y se identificaron las posiciones de lisina. Se identificaron seis cambios (Figura 10) que convirtieron el posicionamiento de lisina para parecerse más al hallado en c6.5 (Figura 19).

5. Cada posible cambio (9 en total en este ejemplo) identificado se realiza en el fragmento de anticuerpo como una única mutación en el gen de anticuerpo. La mutagénesis se realizó usando el sistema Stratagene Quick Change™.

10. Cada anticuerpo mutante de (4) se ensaya para ver si cualquiera de las propiedades de anticuerpo se han alterado o se han destruido tras la mutagénesis. Se llevan a cabo expresión de la proteína de anticuerpo en la célula hospedadora (por ejemplo *E. coli*), purificación, unión de抗igenos (por ELISA y resonancia de plasmón superficial de BIACore), unión celular (por ELISA, FACS e inmunomicroscopía), ensayos de estabilidad (temperatura, despliegamiento inducido por urea y estabilidad en suero).

15. Se conservan mutaciones que no alteran significativamente la estabilidad y función del anticuerpo, las que sean perjudiciales se descartan.

16. Todas las mutaciones se combinan en un gen de anticuerpo, formando una proteína que tiene restos de lisina en nuevas posiciones para acoplamiento con fotosensibilizador optimizado.

17. Este anticuerpo se usa como en los Ejemplos 1-11 para realizar un conjugado de anticuerpo-fotosensibilizador.

20 **Ejemplo 18 - Dirección antimicrobiana con un conjugado de scfv-fotosensibilizador**

1. Se clona un anticuerpo antimicrobiano bien caracterizado, se expresa y se purifica usando las mismas técnicas que se han descrito en el Ejemplo 1 (anterior).

2. Se unen fotosensibilizadores como se ha descrito en los Ejemplos 2-5 (anteriores).

25. 3. Destrucción anti células bacterianas. Inicialmente se llevó a cabo un método rápido para explorar varios conjugados fotosensibilizadores contra varias especies bacterianas. Se recogió un cultivo de una noche de las bacterias por centrifugación y se resuspendieron en PBS. El cultivo bacteriano (1 ml) se extendió en una placa de agar y se permitió que se seca durante 30 minutos.

30. 4. Despues de este tiempo, se situaron 5 µl del fotosensibilizador en las bacterias extendidas y se expusieron a la luz de un diodo de láser (35 mW, 675 nm) durante 2 minutos (densidad de energía = 1,4 J/cm²). Las placas se incubaron durante una noche a 37 °C.

35. 5. Al día siguiente, debería haber crecido un césped bacteriano en la placa excepto donde se aplicó el conjugado de fotosensibilizador y luz. Si se descubrió que aparecía aquí crecimiento bacteriano, no se investigó adicionalmente el conjugado fotosensibilizador correspondiente. Las combinaciones de conjugado fotosensibilizador/bacterias que se descubrió que eran exitosas se analizaron adicionalmente de la siguiente manera (método modificado de [93, 94]):

40. 6. Se recogió un cultivo de una noche de bacterias y se resuspendió en PBS. Se tomó una alícuota (100 µl) de las bacterias y se añadió a pocillos de una placa de 24 pocillos. Despues se añadieron 100 µl de conjugado de fotosensibilizador diluido en serie a cada pocillo por triplicado. Las suspensiones se agitaron durante un periodo de tiempo específico (habitualmente entre 1 y 30 minutos) despues de lo cual las bacterias se recogieron por centrifugación y se lavaron 4 veces con PBS o NaCl 0,15 M. Se resuspendieron los sedimentos bacterianos en PBS o NaCl 0,15 M y se colocaron en una placa de 24 pocillos. Despues se expusieron los pocillos a luz de un diodo de láser (densidad de energía = 1,4 J/cm²). La suspensión completa se retiró de cada pocillo y se diluyó en serie en caldo 2TY. Se retiró una alícuota (25 µl) de cada dilución y se colocó en una mitad de una placa de agar.

45. La suspensión se extendió despues a través de una mitad de la placa de agar y las placas se incubaron durante una noche a 37 °C.

50. 7. Al día siguiente, se contó el número de colonias presente en las placas (es decir placas que tenían entre 20 y 200 colonias). Despues se calculó la supervivencia de células bacterianas comparando con colonias de suspensiones que no tenían tratamiento con fotosensibilizador o luz.

55 **Ejemplo 19 - Captura de imágenes celulares de células SKOV3 con scFv C6.5-PPa**

1. Se lavaron cubreobjetos redondos en etanol y se aclararon en PBS. Despues se colocaron cubreobjetos en placas de cultivo tisular de 12 pocillos.

55. 2. Las células SKOV3 se tripsinizaron y se lavaron con PBS. El sedimento celular se resuspendió en medio de McCoy y las células se sembraron en los cubreobjetos a 2×10^5 células/ml. Las células se incubaron durante una noche a 37 °C y CO2 5 %.

60. 3. Los cubreobjetos con las células adherentes se aclararon cuidadosamente en PBS y se añadió C6-PPa o PBS a los pocillos. Las células se incubaron a 37 °C y CO2 5 % durante 30 minutos despues de lo cual se lavaron cuidadosamente con PBS.

65. 4. Las células se fijaron en los cubreobjetos incubando en 2 ml de paraformaldehído al 4 % durante 60 minutos a temperatura ambiente. Despues de este tiempo, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se invirtieron con el lado de las células hacia abajo en portaobjetos de vidrio. Los bordes de los cubreobjetos se sellaron despues usando

esmalte de uñas.

5. Se realizó después captura de imágenes de fluorescencia usando un láser de Ar+ (418 nm) como fuente de excitación, usando un microscopio confocal de exploración de láser Leica, las imágenes se muestran en la figura 20 y 24, y el espectro de emisión se muestra en la figura 21 y 24.

10 Las Figuras 24a y 24e muestran respectivamente las líneas celulares negativas para HER-2 y positivas para HER-2 incubadas con la misma cantidad de PPa libre con espectros de emisión respectivos correspondientes en las Figuras 24b y 24f. Las imágenes y espectros de emisión muestran que las células KB captan el PPa poco más de 2 veces mejor que las células SKOV3. Las Figuras 24c y 24g muestran las líneas celulares negativas y positivas para HER2 incubadas con C6-PPa (cantidad equivalente de PPa a la Figura 24a, b, e, f) y los espectros de emisión correspondientes se muestran en las Figuras 24d y 24h.

15 El scFv C6.5 claramente ha influido en la dirección del PPa con fluorescencia muy débil, no asociado con la longitud de onda de emisión de PPa, que se observa en las células KB. Sin embargo se ve fuerte fluorescencia basada en PPa en la línea celular SKOV3. Las superposiciones de transmisión (Figura 24i y 24j) muestran más claramente que el PPa se extiende por toda la célula con tinción puntual, de tipo endosómico.

Ejemplo 20 - Conjugados de anticuerpo F1, GP6 y D1.3 en comparación con C6.5

20 Se expresaron F1 y GP6 (fosfatasa alcalina placentaria anti humano) y D1.3 (31) en pHEN2. La expresión y purificación de todos los scFv fue la misma que se ha descrito anteriormente para C6.5.

Acoplamiento de fotosensibilizador pirofeoforbida-a con scFv.

25 Se sintetizó pirofeoforbida-a succinimidil éster para acoplamiento con el scFv de la siguiente manera. A una solución protegida de la luz de la pirofeoforbida-a (50 mg, 0,094 mmol) en una mezcla de DCM/THF seco (9:1) se añadió N-hidroxisuccinimida (12,9 mg, 0,11 mmol) seguido de diciclohexilcarbodiímidida (DCC) (23,2 mg, 0,11 mmol).

30 Después de agitar durante 12 horas (a temperatura ambiente), la diciclohexilurea precipitada se separó por filtrado y los disolventes se retiraron. El producto en bruto se captó en un volumen pequeño de cloroformo y se precipitó por la adición de hexano. El precipitado se recogió, se lavó bien con hexano y el producto en bruto resultante se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con hexano 2 % en etil acetato (R_f 0,66). El producto aislado se volvió a cristalizar a partir de DCM/hexano para proporcionar succinimidil éster puro en rendimiento del 70 %.

35 35 El pirofeoforbida-a succinimidil éster se resuspendió en DMSO 100 % y se añadió a una concentración de 52,8 mM a MFE-23, C6.5 o HuBC1 3,3 mM en PBS que contenía acetonitrilo 6% y con agitación continua a 40 °C durante 30 minutos. Los fotoinmunconjungados (PIC) se dializaron después frente a PBS con un cambio de tampón.

40 40 Para la comparación de C6.5, F1, GP6 y D1.3, se ajustaron las concentraciones de todos los scFv de modo que fueran iguales que GP6 lo que proporcionó la expresión más baja de todos los scFv. Los scFv se acoplaron con PPa a una concentración de 0,3 mM. No hubo precipitación de la proteína antes del acoplamiento y el conjugado de scFv-PPa permaneció soluble a concentraciones de 0,5 mg/ml o inferiores.

45 45 Se llevó a cabo SDS-PAGE como se ha descrito para C6.5 anteriormente y se tiñó con azul de Coomassie. Se transfirieron geles no teñidos usando un aparato de transferencia semiseco (Biorad) en nitrocelulosa y se secó suavemente.

50 50 La fluorescencia se visualizó excitando el PPa en la mancha de transferencia en un transiluminador de UV a longitud de onda corta. Como ejemplo de un cálculo para determinar la relación PPa: scFv, la absorbancia de PPa 65 mg/ml proporciona 1 UA a 670 nm. Por lo tanto 0,2 UA es igual a PPa 13 mg/ml lo que es igual a PPa $2,4 \times 10^{-5}$ M (PM=535). Este se encontró acoplado con un scFv a una concentración de 50 mg/ml (véase Figura 1B), que es igual a $1,7 \times 10^{-6}$ M (PM=30.000). La relación resulta ser de 14,1:1, que se convierte en 9,9:1 después de corregir con respecto a unión no covalente al 30 %.

Resultados

60 60 El perfil de absorbancia de PPa libre en DMSO 100 % y PBS/DMSO 1,9 % se muestra en la Figura 22A. Ambos muestran los picos característicos aproximadamente a 400 nm (pico de Soret), picos menores entre 500 y 630 nm y la banda Q a 670 nm. La Figura 22B muestra el perfil para el scFv C6.5 acoplado con PPa. Los picos permanecen agudos y similares al de PPa libre. La absorbancia a 670 nm se usó para determinar la concentración de PPa y se usó para calcular la relación de PPa:scFv que era de $11,92 \pm 1$ (media de 5 reacciones de acoplamiento independientes). Esto proporciona una relación efectiva de aproximadamente 8:1 después de corrección con respecto a una cantidad pequeña (30 %) de unión no covalente. El perfil de PPa cuando se une con el scFv MFE se muestra en la Figura 22C.

Se acoplaron otros cuatro scFv con PPa para entender los factores importantes para obtener buenas relaciones de acoplamiento (Figura 22D). scFv D1.3-PPa proporciona un patrón de absorbancia cercano al "ideal" ejemplificado por el scFv C6.5, scFv F1-PPa es ligeramente menos eficaz.

- 5 Sin embargo, scFv GP6-PPa y scFv HuBC-1-PPa muestran malos perfiles con picos ampliados, lo que indica posible agregación. La relación de PPa:scFv para todos los experimentos de acoplamiento de scFv se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6 relaciones de acoplamiento de PPa: scFv

Relaciones de acoplamiento de PPa: scFv efectivas determinadas por comparación con una curva patrón de PPa y con corrección para unión no covalente al 30 %.

ScFv	Relación PPa:scFv
C6.5	8,3
MFE-23 (nueva)	6,0
MFE-23 (congelada)	3,0
D1.3	6,1
F1	5,1
GP6	3,1
HuBC-1	2,1

- 10 El alineamiento de secuencia (Figura 26) de los scFv usados en este estudio reveló que C6.5, que proporciona acoplamiento reproducible y buenos rendimientos de oxígeno singlete, tiene más lisinas que se predice que están espacialmente separadas en comparación con scFv que realizan PIC peores (HuBC-1, GP6 y F1).

15 **Ejemplo 21 - Preparación de Verteporfina (Visudyne™) succinimidil éster (Figura 27)**

Se obtuvo Verteporfina como se ha descrito en Scherrer *et al.* (1986) J. Org. Chem. 51: 1094-1100.

- 20 1. El Verteporfina succinimidil éster (Figura 27; Compuesto "b") se preparó como se ha descrito para PPa. A una solución protegida de la luz de verteporfina (6 mg) en THF seco (5 ml), se añadió N-hidroxisuccinimida (3 mg) seguido de diciclohexilcarbodiimida (DCC, 6 mg).
2. La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente con nitrógeno, momento en el cual se había consumido todo el material de partida.
- 25 3. Se evaporó el disolvente y se purificó el producto en bruto por cromatografía en columna en gel de sílice, se cargó como una solución en DCM y se eluyó con etil acetato (R_f 0,74) para proporcionar verteporfina succinimidil éster puro en un rendimiento del 75%. MS (FAB+) 832 (M+).
4. Se descongeló una solución de reserva de scFv C6.5 a 500 μ g/ml a temperatura ambiente y se añadieron 200 μ l a 706 μ l de PBS. Se añadió acetonitrilo (60 μ l) a la solución. La solución se agitó en hielo hasta que se enfrió.

30 **Ejemplo 22 – Conjugación de scFv c6.5 con Verteporfina (Visudyne™) - sistema de disolvente 1**

- 35 1. Se añadió después Verteporfina (Visudyne™) succinimidil éster compuesto en DMSO 100% (34 μ l) a partir de una solución de reserva de 1,58 mM al scFv C6.5 con agitación continua (para proporcionar 16 equivalentes de Verteporfina (Visudyne™)). La mezcla se mantuvo en hielo y en oscuridad, con agitación durante 30 minutos, momento en el cual la solución se situó en tubos de diáisis y se dializó frente a 5 l de PBS a 4 °C durante una noche en oscuridad.
- 40 2. Cada muestra del conjugado se colocó en una cubeta de cuarzo y se procesó un perfil de absorbancia frente a un blanco que contenía PBS. Se midió el valor de absorbancia a 410 nm y se determinó la concentración de PS en g/ml comparando con una curva patrón de Verteporfina (Visudyne™).

45 **Ejemplo 23 – Conjugación de scFv MFE-23 (anti CEA) con Verteporfina (Visudyne™) - sistema de disolvente 2**

1. Se descongeló una solución de reserva de MFE-23 a 500 μ g/ml a temperatura ambiente y se añadieron 200 μ l a 706 μ l de PBS. Se añadió acetonitrilo (60 μ l) a la solución. La solución se agitó en hielo hasta que se enfrió.
2. Se añadió después Verteporfina (Visudyne™) succinimidil éster (34 μ l) de una solución de reserva de DMSO 1,58 mM al MFE-23 con agitación continua (para proporcionar 16 equivalentes de Verteporfina (Visudyne™)). La mezcla se mantuvo en hielo y en oscuridad, con agitación durante 30 minutos, después de lo cual la solución se situó en tubos de diáisis y se dializó frente a 5 l de PBS a 4 °C durante una noche en oscuridad.
3. Cada muestra del conjugado se colocó en una cubeta de cuarzo y se procesó un perfil de absorbancia frente a

un blanco que contenía PBS. Se midió el valor de absorbancia a 410 nm y se determinó la concentración de PS en g/ml comparando con una curva patrón de Verteporfina (Visudyne™). La relación de Verteporfina (Visudyne™):MFE-23 fue por lo tanto entre 8:1 y 10:1.

5 **Ejemplo 24 - Caracterización fotofísica de un conjugado de scFV-Verteporfina (Visudyne™) (Figura 28)**

1. Se realizaron diluciones en serie (concentraciones divididas a la mitad) de los conjugados en PBS y la absorbancia se midió a una longitud de onda de excitación de 690 nm y una longitud de onda de emisión de 680 nm.
- 10 2. Estas se compararon con Verteporfina (Visudyne™) en PBS (Figura 28).

Ejemplo 25 - Citotoxicidad in vitro de un conjugado de scFv c6.5-Verteporfina (Visudyne™) (Figura 29).

- 15 1. Se midió la citotoxicidad celular *in vitro* de la siguiente manera: las células diana (en este ejemplo, se usaron células SKOV3 como células positivas para antígeno y se usaron células KB como células negativas para antígeno) se mantuvieron a 37 °C, CO₂ 5 % en medio (DMEM) complementado con suero de ternero fetal 10 % y penicilina/estreptomicina 5 mM en un matraz de 75 cm². Para células SKOV3, el medio usado fue medio 5A de McCoy complementado con FBS 15 %, penicilina/estreptomicina 5 mM.
- 20 2. Cuando fueron confluyentes al 70-80 %, las células se lavaron en PBS y se añadieron 5 ml de tripsina. El matraz se incubó a 37 °C, CO₂ 5 % durante 15 minutos o hasta que las células se habían separado del matraz. Las células se colocaron después en un tubo Falcon de 50 ml y la tripsina se desactivó añadiendo 15 ml de DMEM o medio de McCoy.
- 25 3. Se extrajeron células (20 µl) del tubo y se colocaron en un hemocitómetro para su recuento. Las células restantes se recogieron a 1800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento se resuspendió suavemente en 1 ml de DMEM o medio de McCoy. Las células se resuspendieron exhaustivamente y se añadieron 19 ml adicionales de DMEM o medio de McCoy. Las células se diluyeron en DMEM o medio de McCoy en consecuencia para proporcionar 2 x 10⁶ células/ml. Después se añadieron células (50 µl) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubaron durante una noche a 37 °C y CO₂ 5%.
- 30 4. Se llevó a cabo el siguiente procedimiento con luz tenue: al día siguiente, el conjugado de diluyó en PBS para proporcionar concentraciones de C6.5 equivalentes a 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 y 0,78 µg/ml. Las células se lavaron una vez con PBS y se añadieron 50 µl del conjugado a pocillos por cuadruplicado. También se incluyeron pocillos de control (pocillos con conjugado añadido pero no expuestos a la luz, y pocillos sin conjugado añadido ni expuestos a la luz). Se había determinado en experimentos previos que la luz de láser por sí sola no tenía ningún efecto en la viabilidad celular, de modo que no se incluyeron controles de "solamente luz" a no ser que cambiase la fuente de luz o la dosis de energía de la luz.
- 35 5. Las células se incubaron en el conjugado o PS libre (la concentración varía) durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ 5 % y después se lavaron 3 veces con PBS. Se añadió PBS (50 µl) a cada pocillo y los pocillos por cuadruplicado se expusieron a luz de láser durante 2 minutos (dosis de energía = 4,2 J; densidad de energía = 1,4 J/cm²).
- 40 6. El PBS se retiró de cada pocillo y se añadieron 100 µl de DMEM o medio de McCoy. Las placas se envolvieron sueltas en papel metalizado, pero se cubrieron adecuadamente de modo que no pudiera entrar luz ambiental. Las placas se incubaron después como anteriormente durante 48 horas, después de lo cual se llevó a cabo un ensayo de destrucción celular.
- 45 7. Se llevaron a cabo ensayos de destrucción celular usando los kits Cytotox-96 (de acuerdo con el protocolo de Promega). Las células se lavaron 3 veces con PBS y se añadieron 50 µl de solución de lisis celular. Las placas se incubaron durante 60 minutos a 37 °C en oscuridad. Después de este tiempo, se añadieron 50 µl de solución de sustrato (lo que indica la cantidad de lactato deshidrogenasa en células). Este se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual, se añadieron 50 µl de solución de parada (ácido acético 0,5 M). Las suspensiones celulares se retiraron de los pocillos y se colocaron en una placa de microtitulación nueva. La absorbancia se midió después a 690 nm en un lector de placas de microtitulación.
- 50 8. Se determinaron las muertes celulares y se expresaron como un porcentaje de los controles (Figura 29).

Resultados: Las CI50 son las siguientes:

- 55 Conjugado de C6.5-Verteporfina (Visudyne™) en células SKOV3 = 2,2 µM;
- Conjugado de C6.5-Verteporfina (Visudyne™) en células KB = 28,1 µM;
- Verteporfina (Visudyne™) en células SKOV3 = 15,3 µM;
- Verteporfina (Visudyne™) en células KB = 10 µM.

60 Por lo tanto, cuando se dirige usando el scFv C6.5, la Verteporfina (Visudyne™) es 7 veces más potente y 13 veces más específica.

Ejemplo 26 - Formulaciones farmacéuticas y administración.

65 Un aspecto adicional de la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéutica o

veterinariamente aceptable.

Preferentemente, la formulación es una dosificación unitaria que contiene una dosis o unidad diaria, subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

5 Los compuestos de la invención normalmente se administrarán por vía oral o por cualquier vía parenteral, en forma de una formulación farmacéutica que comprenda el principio activo, opcionalmente en forma de una sal de adición de ácidos, o bases, orgánica, o inorgánica, no tóxica, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y el paciente para tratar, así como de la vía de administración, las composiciones pueden 10 administrarse a diversas dosis.

15 En terapia humana, los compuestos de la invención pueden administrarse solos pero generalmente se administrarán en mezcla con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado seleccionado con respecto a la vía pretendida de administración y práctica farmacéutica convencional.

20 15 Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden administrarse por vía oral, por vía bucal o por vía sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saporíferos o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Los compuestos de la invención también pueden administrarse mediante inyección intracavicular.

25 20 Dichos comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetylcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga.

30 25 Adicionalmente, pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, gliceril behenato y talco.

35 30 También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de la invención pueden combinarse con diversos agentes edulcorantes o saporíferos, materia colorante o colorantes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

40 35 Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intraventricular, por vía intraesternal, por vía intracraneal, por vía intramuscular o por vía subcutánea, o pueden administrarse por técnicas de infusión. Se usan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deberían tamponarse de forma adecuada (preferentemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se consiguió fácilmente por técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

45 40 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estéril acuosa y no acuosa que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas y frascos sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (lioofilizada) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito.

55 45 Para administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosificación diario de los compuestos de la invención habitualmente será de 1 mg/kg a 30 mg/kg. Por lo tanto, por ejemplo, los comprimidos o cápsulas del compuesto de la invención pueden contener una dosis de compuesto activo para administración individualmente o dos o más cada vez, según sea apropiado. El médico en cualquier caso determinará la dosificación real que será la más adecuada para cualquier paciente individual y esta variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular. Las dosis anteriores son ejemplares del caso medio. Puede haber, por supuesto, casos individuales en los que se requieran intervalos de dosificación superiores o inferiores y estos están dentro del alcance de la presente invención.

60 55 Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación y se suministran de manera conveniente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de pulverización de aerosol a partir de un recipiente presurizado, pulverizador o nebulizador con el uso de un propelador adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3) o 1,1,1,2,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas

- adequado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador puede contener una solución o suspensión del compuesto activo, por ejemplo usando una mezcla de etanol y el propelador como el disolvente, que puede contener adicionalmente lubricante, por ejemplo sorbitán trioleato. Las cápsulas y 5 cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla de polvo de un compuesto de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.
- 10 Se disponen preferentemente formulaciones de aerosol o de polvo seco de modo que cada dosis medida o "descarga" suministra una dosis apropiada de un compuesto de la invención para su suministro al paciente. Se apreciará que la dosis diaria general con un aerosol variará de paciente a paciente, y puede administrarse en una dosis única o, más habitualmente, en dosis divididas a lo largo del día.
- 15 Como alternativa, los compuestos de la invención pueden administrarse en forma de un supositorio o pesario, o pueden aplicarse por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo de uso externo. Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo. También pueden administrarse por la vía ocular, particularmente para el tratamiento de enfermedades del ojo.
- 20 Para uso oftálmico, los compuestos de la invención pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina estéril, con pH ajustado, isotónica o, preferentemente, como soluciones en solución salina estéril, con pH ajustado, isotónica, opcionalmente en combinación con un conservante tal como cloruro de bencilarconio. Como alternativa, pueden formularse en una pomada tal como vaselina.
- 25 Para aplicación por vía tópica a la piel, los compuestos de la invención pueden formularse como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenoglicol, compuesto de polioxietilen polioxitriptófano, cera emulsionante y agua. Como alternativa, pueden formularse como una loción o crema adecuada, suspendidos o disueltos en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, 30 sorbitán monoestearato, un polietilenoglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.
- 35 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen grageas que comprenden el principio activo en una base con sabor, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y colutorios que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.
- 40 En general, en seres humanos, la administración oral o tópica de los compuestos de la invención es la vía preferida, siendo la más conveniente. En circunstancias en las que el receptor padece un trastorno de deglución o alteración de la absorción farmacológica después de administración oral, el fármaco puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo por vía sublingual o por vía bucal.
- 45 Para uso veterinario, se administra un compuesto de la invención como una formulación adecuadamente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración que serán los más apropiados para un animal particular.

Referencias

- [1] Price y Sikora (eds). Treatment of Cancer. Chapman & Hall 1995
 50 [2] Press, OW y Rasey, J (2000). Semin Oncol. 6, 62-73. Principles of Radioimmunotherapy for hematologists and oncologists
 [3] Affleck, K *et al* (1992). Br. J. Cancer 65, 838-844. Monoclonal antibody targeting of methotrexate (MTX) against MTX-resistant tumour cell lines.
 [4] Beers R *et al*. (2000). Clin Cancer Res. 6, 2835-43. Immunotoxins with increased activity against epidermal growth factor receptor VIII-expressing cells produced by antibody phage display.
 55 [5] Rosenkranz, A. A *et al* (2000). Immunol. And Cell Biol. 78, 452-64. Targeted intracellular delivery of photo sensitizers to enhance photodynamic therapy.
 [6] Dolmans *et al*. (2003). Nature Rev. Cancer 3, 380-386. Photodynamic therapy for cancer.
 [7] Hudson PJ. (2000). Expert Opin Investig Drugs 9, 1231-42 Recombinant antibodies: a novel approach to cancer diagnosis and therapy.
 60 [8] Borsi L, Balza E, Carnemolla B, Sassi F, Castellani P, Berndt A, Kosmehl H, Biro A, Siri A, Orecchia P, Grassi J, Neri D y Zardi L (2003) Blood. 102, 4384-92. Selective targeted delivery of TNFalpha to tumor blood vessels.
 [9] Kuby (2000). Immunology, 4^a Ed. W. H. Freeman.
 [10] Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nature Biotechnology (2005) 23, 1105-16
 65 [11] Milenic DE, Brady ED y Brechbiel MW (2004) Nat Rev Drug Discov. 3, 488-99. Antibody-targeted radiation

- cancer therapy.
- [12] Harris M (2004) Lancet Oncol. 5, 292-302. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer.
- [13] Wu AM y Senter PD. Arming antibodies: Prospects and challenges for Immunoconjugates Nature Biotechnology (2005) 23, 1137-46 Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies.
- [14] Deonarain, MP, Rowlinson-Busza, G, George, AJ y Epenetos, AA, (1997) Protein Eng. 10, 89-98. Redesigned anti-human placental alkaline phosphatase single-chain Fv: soluble expression, characterization and in vivo tumour targeting.
- [15] Batra SK, Jain M, Wittel UA, Chauhan SC y Colcher D (2002) Curr Opin Biotechnol. 13, 603-8. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies.
- [16] Boxer GM et al. (1994). Br. J. Cancer 69, 307-14. Localisation of monoclonal antibodies reacting with different epitopes on carcinoembryonic antigen (CEA)-implications for targeted therapy.
- [17] Little M, Kyprianov SM, LeGall F y Moldenhauer G (2000). Immunol Today 21, 364-70. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies.
- [18] Verhaar MJ et al. (1995). Int J Cancer 61, 497-501 A single chain Fv derived from a filamentous phage library has distinct tumor targeting advantages over one derived from a hybridoma.
- [19] Begent, RH et al. (1996). Nat. Med. 2, 979-84 Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library.
- [20] Epenetos AA, Snook D, Durbin H, Johnson PM, Taylor-Papadimitriou (1986). Cancer Res. 46, 3183-91. Limitations of radiolabeled monoclonal antibodies for localization of human neoplasms.
- [21] Gangopadhyay, A et al. (1996). Nucl. Med. Biol. 23, 257-61 Modification of antibody isoelectric point affects biodistribution of 111-indium-labeled antibody.
- [22] Chen SY et al. (1995). Gene Ther. 2, 116-23. Design of a genetic immunotoxin to eliminate toxin immunogenicity.
- [23] Deonarain MP y Epenetos AA (1998) Br. J. Cancer. 77, 537-46 Design, characterization and anti-tumour cytotoxicity of a panel of recombinant, mammalian ribonuclease-based immunotoxins.
- [24] Linardou, H. et al. (2000) Int. J. Cancer 86, 561-569 A recombinant cytotoxic chimera based on mammalian deoxyribonuclease-
- [25] Bonifacino JS y Traub LM (2003) Annu Rev Biochem. 72, 395-447. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes.
- [26] Ghettie, V. y Vitetta, E. (1994) Pharmacol. Ther. 63, 209-34. Immunotoxins in the therapy of cancer: from bench to clinic.
- [27] Ancey C, Kuster A, Haan S, Herrmann A, Heinrich PC y Muller-Newen G (2003) J. Biol. Chem. 278, 16968-72. A fusion protein of the gp130 and interleukin-6Ralpha ligand-binding domains acts as a potent interleukin-6 inhibitor.
- [28] Korner M, Waser B y Reubi JC (2005) Int J Cancer 115, 734-41. Neuropeptide Y receptors in renal cell carcinomas and nephroblastomas.
- [29] Koide A, Bailey CW, Huang X y Koide S (1998) J Mol Biol. 284, 1141-51. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins.
- [30] Holt LJ, Herring C, Jespers LS, Woolven BP y Tomlinson IM (2003) Trends Biotechnol. 21, 484-90. Domain antibodies: proteins for therapy.
- [31] Schlehuber S y Skerra A (2001) Biol. Chem. 382, 1335-42. Duocalins: engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold.
- [32] Binz HK, Amstutz P, Kohl A, Stumpf MT, Briand C, Forrer P, Grutter MG y Pluckthun A (2004) Nat Biotechnol. 22, 575-82. High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries.
- [33] Vasserot, AP et al (2003) Drug Discovery Today 8, 118-126. Optimization of protein therapeutics by directed evolution
- [34] Hopper, C. (2000). Lancet Oncology 1, 212-219. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer.
- [35] Brown, S, Brown, E y Walker, I (2004) Lancet Oncology 5, 497-508. The present and future of photodynamic therapy in cancer treatment.
- [36] Schmidt-Erfurth U. et al. (1999). Arch. Ophthalmol. 117, 1329-1345. Treatment of Age-related Macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) study group. Photodynamic therapy of subfoveal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin.
- [37] Leman JA y Morton CA (2002) Expert Opin Biol Ther. 2, 45-53. Photodynamic therapy: applications in dermatology.
- [38] Yamaguchi A, Woodburn KW, Hayase M, Hoyt G, Robbins RC. (2001). Transplantation 71, 1526-32. Photodynamic therapy with motexafina lutetium (Lu-Tex) reduces experimental graft coronary artery disease.
- [39] Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. (2004). J Periodontol. 75, 1343-9. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy.
- [40] Demidova TN, Hamblin MR. (2004). Int J Immunopathol Pharmacol. 17, 245-54. Photodynamic therapy targeted to pathogens.
- [41] Polo, L. et al. (1992). Cancer Letts 66, 217-23. The distribution of the tumour photosensitizers Zn(II)-phthalocyanine and Sn (IV)-etiopurpurin among rabbit plasma proteins.
- [42] Moan J y Berg K (1992). Photochemotherapy of cancer-experimental research. Photochem. Photobiol. 55, 931-948
- [43] Kessel D et al (2003). Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyins varying in charge

- distributions. *Photochem. photobiol.* 78, 431-435
- [44] Dellinger, M *et al.* (1996). *Photochem. Photobiol.* 64, 182-7 Apoptosis or necrosis following Photfrin photosensitization: Influence of the incubation protocol.
- 5 [45] Ahmad, N. *et al* (1998). *PNAS USA* 95, 6977-6982.Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/P21 leading to cell cycle arrest and apoptosis.
- 10 [46] Fiers, W. *et al.* (1998). *Oncogene* 18, 7719-7730.More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen species.
- [47] Koudinova *et al* (2003) *Int J. Cancer* 104, 782-789. TOOKAD (Pd-bacteriopheophorbide) [48] Dolmans DE, Kadambi A, Hill JS, Flores KR, Gerber JN, Walker JP, Rinkes IH, Jain RK, Fukumura D. (2002). *Cancer Res.* 62, 4289-94. Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy.
- 15 [49] Melnikova VO, Bezdetnaya LN, Brault D, Potapenko AY, Guillemin F. (2000). *Int J Cancer* 88, 798-803.En-hancement of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-sensitized photodynamic treatment on human tumor xenografts using a water-soluble vitamin E analogue, Trolox.
- 20 [50] Westerman *et al.* (1998) *Int J. Cancer* 76, 842-50. Long circulating half0life and high tumor selectivity of the photosensitizermeta tetrahydroxyphenylchlorin conjugated to polyethylene glycol in nude mice grafted with a human colon carcinoma
- [51] van Nostrum (2004). *Advances in Drug Delivery Rev.* 56, 9-16. Polymeric micelles as carriers.
- 25 [52] Nordquist, RE y Chen WE (1996) WO9631237. Cancer treatment by photodynamic therapy in combination with an immunoadjuvant.
- [53] Meade C y Hyde C (2004) *Br. J. Ophthal.* 88, 212-217. Photodynamic therapy with verteporfin is effective, but how big is its effect? Results of a systematic review.
- 30 [54] Wyss P, Schwarz V, Dobler-Girdzinaite D, Hornung R, Walt H, Degen A, Fehr M. (2001) *Int J Cancer* 93, 720-24. Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin-type photosensitizer.
- 35 [55] Cuenca RE, Allison RR, Sibata C, Downie GH. (2004) *Annals Surg. Oncol.* 11, 322-27. Breast cancer with chest wall progression: treatment with photodynamic therapy
- [56] Lou PJ, Jager HR, Jones L, Theodossy T, Bown SG, Hopper C (2004). *Br J Cancer.* 91, 441-6. Interstitial photodynamic therapy as salvage treatment for recurrent head and neck cancer.
- 40 [57] Jager HR, Taylor MN, Theodossy T, Hopper C. (2005). MR imaging-guided interstitial photodynamic laser therapy for advanced head and neck tumors.*AJNR Am J Neuroradiol.* 26, 1193-200.
- [58] Wagnieres G, Hadjur C, Grosjean P, Braichotte D, Savary JF, Monnier P y van den Bergh H (1998) *Photochem Photobiol.* 68, 382-7. Clinical evaluation of the cutaneous phototoxicity of 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin.
- 45 [59] Moriwaki SI, Misawa J, Yoshinari Y, Yamada I, Takigawa M, Tokura Y (2001) *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 17, 241-3. Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (PhotofrinTM).
- [60] Murrer LH, Hebeda KM, Marijnissen JP y Star WM (1999) *Br J Cancer* 80, 744-55. Short- and long-term normal tissue damage with photodynamic therapy in pig trachea: a fluence-response pilot study comparing PhotofrinTM and mTHPC.
- 50 [61] Baas P, van Mansom I, van Tinteren H, Stewart FA, van Zandwijk N (1995) *Lasers Surg Med.* 16, 359-67. Effect of N-acetylcysteine on PhotofrinTM-induced skin photosensitivity in patients.
- [62] Nseyo UO, Shumaker B, Klein EA, Sutherland K (1998) *J Urol.* 160, 39-44. Photodynamic therapy using porfimer sodium as an alternative to cystectomy in patients with refractory transitional cell carcinoma in situ of the bladder.
- 55 [63] Vrouenraets, MB, Visser GW, Stewart FA, Stigter M, Oppelaar H, Postmus PE, Snow GB, van Dongen GA. (1999). *Cancer Res.* 59, 1505-1513. Development of meta- tetrahydroxypheneylchlorin-monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy.
- [64] Vrouenraets, MB, Visser GW, Loup C, Meunier B, Stigter M, Oppelaar H, Stewart FA, Snow GB, van Dongen GA.. (2000) *Int. J. Cancer* 88, 108-114. Targeting of a hydrophilic photosensitizer by use of internalizing monoclonal antibodies: A new possibility for use in photodynamic therapy.
- 60 [65] van Dougen GAMS, Visser GWM y Vrouenraets, MB (2004). *Adv. Drug Del. Rev* 56, 31-52. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer.
- [66] Vrouenraets, MB, Visser GWM, Stigter M, Oppelaar H, Snow G y van Dongen GAMS (2001). Targeting pf aluminium (III) phthalocyanine tetrasulfonate by use of internalizing monoclonal antibodies: Improved efficacy in photodynamic therapy.
- 65 [67] Hudson, R, *et al* (2005). *Br. J. Cancer* 92, 1442-1449. The development and characterisation of porphyrin isothiocyanate-monoclonal antibody conjugates for photo-immunotherapy.
- [68] Savellano MD, Pogue BW, Hoopes PJ, Vitetta ES y Paulsen KD (2005). *Cancer Res.* 65, 6371-9. Multipeptope Her2 targeting enhances photoimmunotherapy of Her2 expressing cancer cells with pyropheophorbide-a immuno-conjugates.
- [69] Savellano MD y Hasan T (2005). *Clin. Cancer. Res* 11, 1658-1668. Photochemical targeting of epidermal growth factor receptor: a mechanistic study.
- [70] Birchler M, Viti F, Zardi L, Spiess B, Neri D (1999). *Nat Biotechnol.* 17, 984-8. Selective targeting and photo-coagulation of ocular angiogenesis mediated by a phage-derived human antibody fragment.
- [71] Roder B y Hackbarth S (2001). Documento WO0108704. Dendrimer-photosensitizer complexes for medical applications.

- [72] Westerman P, Glanzmann T, Andrejevic S, Braichotte DR, Forrer M, Wagnieres GA, Monnier P, van den Bergh H, Mach JP, Folli S (1998) Int J Cancer 76, 842-50. Long circulating half-life and high tumor selectivity of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenylchlorin conjugated to polyethylene glycol in nude mice grafted with a human colon carcinoma.
- 5 [73] Demidova TN, Hamblin MR (2004) Int J Immunopathol Pharmacol. 17, 245-5. Photodynamic therapy targeted to pathogens.
- [74] Deonarain MP y Stafford S (2003). Documento WO03015825. Conjugate
- 10 [75] Glickman RD, Mayo GL, McKinnon SJ, Melendez RE y Kumar NC (2004). WO 080284 A2. Antibody targeted photodynamic therapy
- [76] Mayo GL, Melendez RF, Kumar N, McKinnon SJ y Glickman RD (2003). Am. J. Ophthalmol. 136, 1151-2. Antibody-targeted photodynamic therapy
- [77] Hasan T, Savellano MD y Skobe M (2002) Documento WO 02100326. Photoimmunotherapies for cancer using photosensitizers immunoconjugates and combination therapies
- 15 [78] Akhlymina TV, Jans DA, Rosenkranz AA, Statsyuk NV, Balashova IY, Toth G, Pavo I, Rubin AB, Sobolev AS (1997). J. Biol. Chem: 272, 20328-20331. Nuclear targeting of chlorin e6 enhances its photosensitizing activity.
- [79] Cavanaugh PG (2002) Breast Cancer Res Treat. 72, 117-30. Synthesis of chlorin e6-transferrin and demonstration of its light-dependent in vitro breast cancer cell killing ability.
- 20 [80] Cavanaugh PG (2002) documento US 20021337901. Synthesis and photodynamic therapy-mediated anti-cancer and other uses of chlorin e6-transferrin.
- [81] Khadem J, Veloso AA Jr, Tolentino F, Hasan T, Hamblin MR (1999). Invest Ophthalmol Vis Sci. 40, 3132-7. Photodynamic tissue adhesion with chlorin(e6) protein conjugates.
- [82] Green AM (2002). Documento WO 02/080754 A2. Methods for using annexin for detecting cell death in vivo and treating associated conditions.
- 25 [83] Storrie B, Tarrago-Trani S (2002). B/B-like fragment for the purposes of photodynamic therapy and medical imaging documento WO 02/067850
- [84] Ray R y Mohr S. (2001) documento WO 0178606. Selective nuclear receptor-targeted systems for delivery of cytotoxins to cancer cells for targeted photodynamic therapy
- [85] Gaboury L y Villeneuve L (1996) documento US 5556992. Novel rhodamine derivatives for photodynamic therapy of cancer and in vitro purging of the leukemias
- 30 [86] Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, Guillemin F, Muller JF, Barberi-Heyob M. (2005). Bioorgan. Med chem. 13, 2799-2808. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy.
- [87] Lutsenko SV, Feldman NB, Finakova GV, Posypanova GA, Severin SE, Skryabin KG, Kirpichnikov MP, Lukyanets EA, Vorozhtsov GN (1999). Tumour Biol. 20, 218-24. Targeting phthalocyanines to tumor cells using epidermal growth factor conjugates.
- 35 [88] Renno RZ, Terada Y, Haddadin MJ, Michaud NA, Gragoudas ES, Miller JW. (2004). Arch Ophthalmol. 122, 1002-1011. Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2.
- [89] Boehm MK, Corper AL, Wan T, Sohi MK, Sutton BJ, Thornton JD, Keep PA, Chester KA, Begent RH, Perkins SJ. (2000). Crystal structure of the anti-(carcinoembryonic antigen) single-chain Fv antibody MFE-23 and a model for antigen binding based on intermolecular contacts. Biochem J. 346, 519-28.
- 40 [90] Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson-P y Winter G (1991) Nucleic Acids Res. 19, 4133-7. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains.
- [91] Enever C, Tomlinson IM, Lund J, Levens M y Holliger P (2005) J. Mol. Biol. 347, 107-20. Engineering high affinity superantigens by phage display.
- 45 [92] Li Y, Moysey R, Molloy PE, Vuidepot AL, Mahon T, Baston E, Dunn S, Liddy N, Jacob J, Jakobsen BK y Boulter JM (2005) Nat. Biotechnol. 23, 349-54. Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display.
- [93] Embleton ML, Nair SP, Cookson BD y Wilson M (2002) J. Antimicrob. Chemother. 50, 857-864. Selective lethal photosensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using an IgG-tin(IV) chlorin e6 conjugate
- 50 [94] Garcia DI y Yahioglu, G (documento WO2004/046151). Porphyrin derivatives
- [95] Sokou NS, Hamblin MR, Deutsch TF y Hasan T (2001). Monoclonal antibody tagged receptor targeted contrast agents for detection of cancer. Proceedings of SPIE, 4259, 115. Biomarkers and Biological Spectral imaging, Eds. Barman GH, Levenson RM y Bornhop DJ.
- 55 [96] Kim JI, Wang C, Kuizon S, Xu J, Barenholz D, Gray PC, Rubenstein R (2005). Simple and specific detection of abnormal prion protein by a magnetic bead-based immunoassay coupled with laser-induced fluorescence spectrofluorometry. J Neuroimmunol 158, 112-9.
- [97] Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. (1997). Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. Nat Biotechnol. 15, 542-6.
- 60 [98] Rusckowski M, Qu T, Chang F, Hnatowich DJ. (1997). Technetium-99m labeled epidermal growth factor-tumor imaging in mice. J Pept Res. 50, 393-401.
- [99] Weissleder R, Tung CH, Mahmood U, Bogdanov A Jr. (1999). In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. Nat Biotechnol. 17, 375-8.
- 65 [100] Pericleous, LM, Richards, J, Epenetos, AA, Courtenay-Luck, N y Deonarain MP (2005). Characterisation and internalization of recombinant humanized HMFG1 antibodies against MUC1. Br J Cancer. 93 pp1257-66

ES 2 459 015 T3

[101] Ward ES. Antibody engineering: the use of Escherichia coli as an expression host. FASEB J. 1992; 6: 2422-7.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un compuesto que comprende un agente fotosensibilizador acoplado con una molécula vehículo, en el que el compuesto comprende una relación de agente fotosensibilizador y molécula vehículo de al menos 3:1, que comprende las etapas de:
- (i) proporcionar un agente fotosensibilizador; en el que el agente fotosensibilizador es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: hematoporfirinas, porfirinas de origen natural; clorinas de origen natural; bacterioclorinas de origen natural; feoforbidas; pirofeoforbida a; fotocloro, clorinas; clorina e6; mono-L-aspartil clorina e6, di-L-aspartil clorina e6; clorina de estaño (IV) e6; bacterioclorofilas de paladio; bacteriofeoforbida de paladio; clorinas sintéticas; bacterioclorinas sintéticas; metatetrahidroxifenil clorina y bacterioclorina; benzoporfirina; monobenzoporfirinas; verteporfina; ftalocianinas; ftalocianinas de aluminio sulfonadas (disulfonadas y tetrasulfonadas); naftalocianinas de aluminio sulfonadas; purpurinas; purpurina-18; octaethylpurpurina de estaño y cinc; etiopurpurina de estaño; verdinas; porfisenos; porfirinas sintéticas; clorinas sintéticas; bacterioclorinas sintéticas; mesotrietylporfirinas sin metales; mesotrietylporfirinas metalizadas; porfirinas de núcleo modificado; porfirinas expandidas (texafirinas); motexafina de lutecio; motexafina de gadolinio; fenotiazinio; azul de metileno; azul de toluidina; cianinas; merocianina 540; colorantes de acridina; colorantes de BODIPY; aza-BODIPY; hipericina; colorantes de escuarina halogenada; colorantes de xanteno halogenado; eosina; rosa Bengal;
 - (ii) proporcionar una molécula vehículo; en el que la molécula vehículo se selecciona de scFv, fragmentos Fab y/o anticuerpos de dominio;
 - (iii) conjugar el agente fotosensibilizador y la molécula vehículo en presencia de un primer y un segundo disolventes apróticos polares y un tampón acuoso, en el que el primer y el segundo disolventes apróticos se seleccionan del grupo que consiste en dimetil sulfóxido (DMSO); acetonitrilo; N,N-dimetilformamida (DMF); HMPA; dioxano; sulfolano; y N-metilpirrolidona; y en el que la relación del primer disolvente aprótico al segundo disolvente aprótico es de aproximadamente 1 a 49 %: 49 a 1 %.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las propiedades físicas y funcionales del agente fotosensibilizador y de la molécula vehículo están sustancialmente inalteradas después del acoplamiento.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el primer y el segundo disolventes apróticos se seleccionan del grupo que consiste en: DMSO; DMF; y acetonitrilo.
4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el primer y el segundo disolventes apróticos son DMSO y acetonitrilo.
5. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 en el que la relación es PBS 92 %: DMSO 2 %: acetonitrilo 6 %.
6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que la etapa de conjugar el agente fotosensibilizador y la molécula vehículo se realiza a una temperatura de entre 0 °C y 5 °C.
7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que la etapa de conjugar el agente fotosensibilizador y la molécula vehículo se realiza durante aproximadamente 30 minutos.
8. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-7 en el que la molécula vehículo es un scFv.
9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que la molécula vehículo es humanizada o humana.
10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que el agente fotosensibilizador es un fotosensibilizador monofuncional.
11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende además la siguiente etapa realizada después de la etapa (iii):
- (iv) acoplar un agente modulador con la molécula vehículo, en donde el agente modulador es capaz de modular la función del agente fotosensibilizador.
12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11 en el que el agente modulador se selecciona del grupo que consiste en: ácido benzoico; ácido benzoico que contiene un grupo azida; ácido 4-azidotetrafluorofenilbenzoico; ácido benzoico que contiene un grupo aromático que tiene un resto de azida; ácido benzoico que contiene un grupo heteroaromático que tiene un resto de azida; análogos de vitamina E; Trolox; butil hidroxil tolueno; propil galato; ácido desoxicólico; ácido ursadesoxicólico.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12 en el que el grupo aromático o el grupo heteroaromático se seleccionan del grupo que consiste en: polifluorobencenos, naftalinas, naftaquinonas, antracenos, antraquinonas, fenantrenos, tetracenos, naftacendionas, piridinas, quinolinas, isoquinolinas, indoles, isoindoles, pirroles, imidazoles, pirazoles, pirazinas, bencimidazoles, benzofuranos, dibenzofuranos, carbazoles, acridinas, acridonas y fenantridinas, xantinas, xantonas, flavonas, cumarinas y sulfenatos de los mismos.
- 5 14. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende además la siguiente etapa realizada después de las etapas (iii) o (iv):
- 10 (v) combinar el compuesto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una formulación farmacéutica.
- 15 15. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el que la distancia entre los agentes fotosensibilizadores acoplados con la molécula vehículo es entre 3,5 ángstrom y 25 ángstrom.
- 15 16. El proceso de acuerdo con la reivindicación 15 en el que la distancia entre los agentes fotosensibilizadores acoplados con la molécula vehículo es entre 20 y 25 ángstrom.
- 20 17. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende además la siguiente etapa realizada antes de la etapa (v) de
- (vi) acoplar un agente de visualización con la molécula vehículo, agente fotosensibilizador o conjugado de los mismos.
- 25 18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17 en el que el agente de visualización es un colorante fluorescente o luminiscente.
- 30 19. Un compuesto que comprende un agente fotosensibilizador acoplado con una molécula vehículo en un resto de aminoácido de la molécula vehículo que puede obtenerse por el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que la molécula vehículo se selecciona de scFv, fragmentos Fab y/o anticuerpos de dominio; y en el que se acoplan agentes fotosensibilizadores en restos de aminoácidos de la molécula vehículo que están preferentemente a dos aminoácidos de distancia (3,5 a 7,5 ángstrom), más preferentemente a tres aminoácidos de distancia (9 a 12 ángstrom), más preferentemente a cuatro aminoácidos de distancia (10-15 ángstrom), aún más preferentemente a cinco aminoácidos de distancia (15-20 ángstrom), todavía más preferentemente a seis aminoácidos de distancia (20-25 ángstrom); en el que el resto de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en: lisina, cisteína; tirosina; serina; glutamato, aspartato y arginina.
- 35 20. Un compuesto que comprende un agente fotosensibilizador acoplado con una molécula vehículo en un resto de aminoácido de la molécula vehículo con una relación de acoplamiento mínima de 3:1 en el que la molécula vehículo se une de forma selectiva con una célula diana, en el que la molécula vehículo se selecciona de scFv, fragmentos Fab y/o anticuerpos de dominio; y en el que se acoplan agentes fotosensibilizadores en la molécula vehículo en restos de aminoácidos que están preferentemente a dos aminoácidos de distancia (3,5 a 7,5 ángstrom), más preferentemente a tres aminoácidos de distancia (9 a 12 ángstrom), más preferentemente a cuatro aminoácidos de distancia (10-15 ángstrom), aún más preferentemente a cinco aminoácidos de distancia (15-20 ángstrom), todavía más preferentemente a seis aminoácidos de distancia (20-25 ángstrom); en el que el resto de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en: lisina, cisteína; tirosina; serina; glutamato, aspartato y arginina.
- 40 21. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 19 o 20 en el que las propiedades físicas y funcionales del agente fotosensibilizador y de la molécula vehículo están sustancialmente inalteradas en la forma acoplada en comparación con las propiedades cuando están en una forma desacoplada.
- 45 22. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 en el que la molécula vehículo es un scFv.
- 50 23. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 en el que la molécula vehículo es humanizada o humana.
- 55 24. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 en el que el agente fotosensibilizador es un fotosensibilizador monofuncional.
- 60 25. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 24 en el que el agente fotosensibilizador es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: hematoporfirinas, porfirinas de origen natural; clorinas de origen natural; bacterioclorinas de origen natural; feoforbidas; pirofeoforbida a; fotocloro, clorinas; clorina e6; mono-L-aspartil clorina e6, di-L-aspartil clorina e6; clorina de estafño (IV) e6; bacterioclorofilas de paladio; bacteriofeoforbida de paladio; clorinas sintéticas; bacterioclorinas sintéticas; metatetrahidroxifenil clorina y bacterioclorina; benzoporfirina; monobenzoporfirina; verteporfina; ftalocianinas; ftalocianinas de aluminio sulfonadas (disulfonadas y

- 5 tetrasulfonadas); naftalocianinas de aluminio sulfonadas; purpurinas; purpurina-18; octaetilpurpurina de estaño y cinc; etiopurpurina de estaño; verdinas; porfisenos; porfirinas sintéticas; clorinas sintéticas; bacterioclorinas sintéticas; mesotriettinilporfirinas sin metales; mesotriettinilporfirinas metalizadas; porfirinas de núcleo modificado; porfirinas expandidas (texafirinas); motexafina de lutecio; motexafina de gadolinio; fenotiazinio; azul de metíleno; azul de toluidina; cianinas; merocianina 540; colorantes de acridina; colorantes de BODIPY; aza-BODIPY; hipericina; colorantes de escuarina halogenada; colorantes de xanteno halogenado; eosina; rosa Bengala.
- 10 26. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 19 a 25 en el que la distancia entre agentes fotosensibilizadores acoplados con la molécula vehículo es de seis aminoácidos (20-25 ángstrom).
- 15 27. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26 que comprende además un agente modulador capaz de modular la función del agente fotosensibilizador para aumentar la producción de oxígeno singlete y especies de oxígeno reactivas.
- 20 28. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 27 en el que el agente modulador se selecciona del grupo que consiste en: ácido benzoico; ácido benzoico que contiene un grupo azida; ácido 4-azidotetrafluorofenilbenzoico; ácido benzoico que contiene un grupo aromático que tiene un resto de azida; ácido benzoico que contiene un grupo heteroaromático que tiene un resto de azida; análogos de vitamina E; Trolox; butil hidroxil tolueno; propil galato; ácido desoxicólico; ácido ursadesoxicólico.
- 25 29. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 28 en el que el grupo aromático o el grupo heteroaromático se seleccionan del grupo que consiste en: polifluorobencenos, naftalinas, naftaquinonas, antracenos, antraquinonas, fenantrenos, tetracenos, naftacendionas, piridinas, quinolinas, isoquinolinas, indoles, isoindoles, pirroles, imidazoles, pirazoles, pirazinas, bencimidazoles, benzofuranos, dibenzofuranos, carbazoles, acridinas, acridonas y fenantridinas, xantinas, xantonas, flavonas, cumarinas y sulfenatos de los mismos.
- 30 30. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 29 comprende además un agente de visualización.
- 35 31. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 30 en el que el agente de visualización es un colorante fluorescente o luminiscente.
- 36 32. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 31 en el que la molécula vehículo es un scFv y el agente fotosensibilizador es pirofeoforbida a.
- 40 33. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 31 en el que la molécula vehículo es un scFv y el agente fotosensibilizador es un monoácido de benzoporfirina (verteporfina)
- 45 34. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 31 en el que la molécula vehículo es un scFv y el agente fotosensibilizador es bacteriofeoforbida de paladio.
- 50 35. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 31 en el que la molécula vehículo es un scFv y el agente fotosensibilizador es un derivado de mono-L-aspartilo de clorina e6.
- 55 36. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 31 en el que la molécula vehículo es un scFv y el agente fotosensibilizador es meta tetrahidroxifenil clorina.
- 60 37. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 31 en el que la molécula vehículo es un scFv y el agente fotosensibilizador es etiopurpurina de estaño (rostaporfina).
- 65 38. Uso del compuesto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 37 en la fabricación de un medicamento para el diagnóstico de una enfermedad que requiere la destrucción de una célula diana.
- 39 Uso del compuesto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 37 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad que requiere la destrucción de una célula diana.
40. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 38 o 39 en el que la enfermedad para tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer; degeneración macular relacionada con la edad; trastornos inmunitarios; enfermedad cardiovascular; e infecciones microbianas incluyendo infecciones virales, bacterianas o fúngicas, enfermedades priónicas tales como BSE y enfermedades orales/dentales tales como gingivitis.
41. El uso de acuerdo con la reivindicación 40 en el la enfermedad para tratar es cáncer de colon, pulmón, mama, cabeza y cuello, próstata, piel, estómago/gastrointestinal, vejiga y lesiones precancerosas tales como esófago de Barrett.

42. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41 en el que el diagnóstico de la enfermedad se realiza por visualización del agente fotosensibilizador o un agente de visualización opcional.
- 5 43. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 42 en el que el compuesto se administra a un paciente antes de la exposición a la luz.
44. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 37 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables.

	H1-H2	FR1	CDR1	FR2
VH1	1-3	1-02	12345678901234567890	1ab23456789
	1-3	1-03	QVQLVQSGAEV <u>KKPGASVVKVSKCKASGYTFT</u>	G--YYMH
	1-3	1-08	QVQLVQSGAEV <u>RKPGASVVKVSKCKASGYTFT</u>	S--YAMH
	1-3	1-18	QVQLVQSGAEV <u>VKKPGASVVKVSKCKASGYTFT</u>	S--YDIN
	1-2	1-U	QVQLVQSGAEV <u>RKPGASVVKVSKCKASGYTFT</u>	S--YGIS
	1-U	1-24	QVQLVQSGAEV <u>RKPGASVVKVSKCKASGYTFT</u>	E--LSMH
	1-3	1-45	QMQLVQSGAEV <u>VKKTGGSSVKVSKCKASGYTFT</u>	Y--RYLH
	1-3	1-46	QVQLVQSGAEV <u>RKPGASVVKVSKCKASGYTFT</u>	S--YYMH
	1-3	1-58	QMQLVQSGPE <u>VKKPGTSVKVSKCKASGETFT</u>	S--SAVQ
	1-2	1-69	QVQLVQSGAEV <u>VKKPGSSVKVSKCKASGGTFS</u>	S--YAIS
	1-2	1-e	QVQLVQSGAEV <u>VKKPGATVKISCKVSKCKASGGTFS</u>	S--YAIS
	1-2	1-f	EVQLVQSGAEV <u>VKKPGATVKISCKVSKCKASGGTFS</u>	D--YYMH
	VH2	3-1/2-1	2-05	QITLKESGPTLV <u>KPTQTLTCTFSGFSLS</u>
		3-1	2-26	QVTILKESGPVLV <u>KPTETLTCTVSGFSLS</u>
		3-1	2-70	QVTILKESGPALV <u>KPTQTLTCTFSGFSLS</u>
	VH3	1-3	3-07	EVQLVESGGGLV <u>QPGGSLRLSCAASGETFS</u>
		1-3	3-09	EVQLIVESGGGLV <u>QPGRSRLSCAASGETED</u>
		1-3	3-11	EVQLIVESGGGLV <u>KPGGSLRLSCAASGETES</u>
		1-1	3-13	EVQLIVESGGGLV <u>QPGGSLRLSCAASGETFS</u>
		1-U	3-15	EVQLIVESGGGLV <u>KPGGSLRLSCAASGETES</u>
		1-3	3-20	EVQLIVESGGGV <u>VVRPGGSLRLSCAASGETED</u>
		1-3	3-21	EVQLIVESGGGLV <u>KPGGSLRLSCAASGETFS</u>
		1-3	3-23	EVQLLESGGGLV <u>QPGGSLRLSCAASGETES</u>
		1-3	3-30	EVQLIVESGGGV <u>VQPGRSRLSCAASGETES</u>
		1-3	3-30.3	EVQLIVESGGGV <u>VQPGRSRLSCAASGETES</u>
		1-3	3-30.5	EVQLIVESGGGV <u>VQPGRSRLSCAASGETFS</u>

Figura 1

1-3	3-33		EVQVLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGGLEWVA
1-3	3-43		EVQVLVESGGGVVQPGGSRLRSLCAASGETED	D--YTMH	WVRQAPGKGGLEWVS
1-3	3-48		EVQVLVESGGGLVQPGGSRLRSLCAASGETED	S--YSMN	WVRQAPGKGGLEWVS
1-U	3-49		EVQVLVESGGGLVQPGRSRLSCTASGETFG	D--YAMS	WERQAPGKGGLEWVG
1-1	3-53		EVQLVETGGGLIOPPGSRLRSLCAASGFTVS	S--NYMS	WVRQAPGKGGLEWVS
1-3	3-64		EVQVLVESGGGLVQPGGSRLRSLCAASGFTFS	S--YAH	WVRQAPGKGGLEYVS
1-1	3-66		EVQVLVESGGGLVQPGGSRLRSLCAASGFTVS	S--NYMS	WVRQAPGKGGLEWVS
1-4	3-72		EVQLVESGGGLVQPGGSRLSIRLCAASGFTFS	D--HYMD	WVRQAPGKGGLEWVG
1-4	3-73		EVQVLVESGGGLVQPGGSRLKLSIRLCAASGFTES	G--SAMH	WVRQASGRKGGLEWVG
1-3	3-74		EVQVLVESGGGLVQPGGSRLRSLCAASGFTFS	S--YWMH	WVRQAPGKGGLEWVS
1-6	3-d		EVQLVESRGVLVQPGGSRLRSLCAASGFTVS	S--NEMS	WVRQPPGKGGLEWVS
VH4	2-1/1-1	4-04	QVQLQESGPGLV K P S GT L SLTCAVSGGSIS	SS--NWS	WVRQPPGKGGLEWIG
2-1	4-28		QVQLQESGPGLV K P S QT L TLTCAVSGYSIS	SS--NWWG	WIRQPPGKGGLEWIG
3-1	4-30.1		QVQLQESGPGLV K P S QT L LTCTVSGGSIS	SGGYYS	WIRQHPGPKGLEWIG
3-1	4-30.2		QLQLOESGSGLV K P S QT L SLTCAVSGGSIS	SGGYSW	WIRQPPGPKGLEWIG
3-1	4-30.4		QVQLQESGPGLV K P S QT L SLTCAVSGGSIS	SGDYYS	WIRQPPGPKGLEWIG
3-1	4-31		QVQLQESGPGLV K P S QT L LTCTVSGGSIS	SGGYYS	WIRQHPGPKGLEWIG
1-1	4-34		QVQLQEWGAGL L KP S ET L SLTCAVYGGFS	G--YYWS	WIRQPPGPKGLEWIG
3-1	4-39		QVQLQESGPGLV K P S ET L SLTCAVYGGFS	SSYYWG	WIRQPPGPKGLEWIG
1-1	4-59		QVQLQESGPGLV K P S ET L LTCTVSGGSIS	S--YYWS	WIRQPPGPKGLEWIG
3-1	4-61		QVQLQESGPGLV K P S ET L LTCTVSGGSIS	SGSYWS	WIRQPPGPKGLEWIG
2-1	4-b		QVQLQESGPGLV K P S ET L LTCAVSGYSIS	SG-YIWG	WIRQPPGPKGLEWIG
VH5	1-2	5-51	EVQLVQSGAEV KK P E SLR I SC K GS Y S F T	S--YWIG	WVRQMPGPKGLEWMG
1-2	5-a		EVQLVQSGAEV KK P E SLR I SC K GS Y S F T	S--YWI	WVRQSPSRGLEWIG
VH6	3-5	6-01	QVQLQOSGPGLV K P S QT L LTCAISGDSVS	SNSAAWN	WIRQSPSRGLEWIG
VH7	1-2	7-4.1	QVQLVQSGSEL KK P G AS V K SC A SG Y TF	S--YAMN	WVRQAPGQGLEWMG

Figura 1 (continuación)

		CDR2	FR3
VH1	1-3	1-02	5 6 7 8 9
	1-3	1-03	012abc3456789012345
	1-3	1-08	WINP--NSGGTNYAQKFQG
	1-2	1-18	WINA--GNGNTKYSQKFQG
	1-U	1-24	WMNP--NSGNTGYAQKFQG
	1-3	1-45	WISA--YNGNTNYAQRLQG
	1-3	1-46	GFDP--EDGETIYAQKFQG
	1-3	1-58	WITP--FNGNTNYAQKFQD
	1-2	1-69	TINP--SGGSTSYAQKFQG
	1-2	1-e	WIVV--GSGNTNYAQKFQE
	1-2	1-e	GIIP--IEGTANYAQKFQG
	1-2	1-e	GIIP--IEGTANYAQKFQG
	1-2	1-e	LVDP--EDGETIYAEKFQG
	3-1	2-05	LIY---WNDDKRYSPSLKS
	3-1	2-26	HIF---SNDEKSYSTSLS
	3-1	2-70	RID---WDDDKFYSTSLKT
VH2	3-1/2-1	3-07	NIKQ---DGSEKYYDSVKG
	3-1	3-09	GISW---NSGSIGYADSVKG
	1-3	3-11	YISS---SGSTIYYADSVKG
	1-1	3-13	AIG---TAGDTYPGSVKG
	1-U	3-15	RIKSRTDGTTDYAAPVKG
VH3	1-3	3-20	GINW---NGGSTGYADSVKG
	1-3	3-21	SISS---SSSYIYYADSVKG

Figura 1 (continuación)

1-3	3-23	AISG-- <u>SGGSTYYADSVKG</u>	RFTI S RDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AK
1-3	3-30	VISY-- <u>DGSNKKYYADSVKG</u>	RFTI S RDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AK
1-3	3-30 . 3	VISY-- <u>DGSNKKYYADSVKG</u>	RFTI S RDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AK
1-3	3-30 . 5	VISY-- <u>DGSNKKYYADSVKG</u>	RFTI S RDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AK
1-3	3-33	VIWY-- <u>DGSNKKYYADSVKG</u>	RFTI S RDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AK
1-3	3-43	LISW-- <u>DGGSTYYADSVKG</u>	RFTI S RDNSKNTLYLQMN SLRTE DTALYYC AKD
1-3	3-48	VISS-- <u>SSSTIYYADSVKG</u>	RFTI S RDNAFKNSL YLQMN SLRDE DTA VYYC AR
1-U	3-49	FIRSKAYGGTTEYTASVKG	RFTI S RDGSKS STAYL QMNSL KTED TAV YYCTR
1-1	3-53	VIY-- <u>SGGSTYYADSVKG</u>	RFTI S RDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AR
1-3	3-64	AISS-- <u>NGGSTYYAN SVKG</u>	RFTI S RDNSKNTLYLQMGSL RAE DM AVYYC AR
1-1	3-66	VIY-- <u>SGGSTYYADSVKG</u>	RFTI S RDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AR
1-4	3-72	RTRNKANSYTT EYASVKG	RFTI S RDDSKNSL KTED TAV YYC AR
1-4	3-73	RIRSKANSYATAYAASVKG	RFTI S RDSSKNTAYL QMNSL KTED TAV YYC TR
1-3	3-74	RINS-- <u>DGSSTSYYADSVKG</u>	RFTI S RDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AR
1-6	3-d	SI---- <u>SGGSTYYADSRKG</u>	RFTI S RDNSKNTLH LQMN SLRAEDTAVYYC AR
		EIY---- <u>HSGSTNNYNPLKS</u>	RVTI SVDRSKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
		YIY---- <u>YSGSTYYNPLKS</u>	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
		YIY---- <u>YSGSTYYNPLKS</u>	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
		YIY---- <u>HSGSTYYNPLKS</u>	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
		YIY---- <u>YSGSTYYNPLKS</u>	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
		YIY---- <u>YSGSTYYNPLKS</u>	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
		EIN---- <u>HSGSTNNYNPLKS</u>	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
		SIY---- <u>YSGSTYYNPLKS</u>	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
		YIY---- <u>YSGSTNNYNPLKS</u>	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
		YIY---- <u>YSGSTYYNPLKS</u>	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
VH4	2-1 /1-1	4-04	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
	2-1	4-28	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
	3-1	4-30 . 1	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
	3-1	4-30 . 2	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
	3-1	4-30 . 4	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
	3-1	4-31	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
	1-1	4-34	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
	3-1	4-39	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
	1-1	4-59	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
	3-1	4-61	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR
	2-1	4-b	RVTI SVDT SKNQESLK LSSV TAA DTAV YYC AR

Figura 1 (continuación)

VH5	1-2	5-51	SIY---HSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSILKLLSSVTAADTAVYYCAR
	1-2	5-a	IIYP--GDSDTTRYSPSFQG	QVTISADRSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
VH6	3-5	6-01	RIDP--SDSYTNYSFPSFQG	HVTISADRSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
VH7	1-2	7-4.1	RTYYR-SKWYNDYAVSVRS	RITINPDTSKKNQFSIQLQNSVTPEDTAVYYCAR
			WINT--NTGNPTYAQGFTG	REVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDEDTAVYYCAR
D1	1-1	RF 1	GTTGT	RF 3
	1-7		GITGT	YNWND
	1-20		GITGT	YNWNY
	1-26		GIVGAT	YNWND
D2	2-2	RF 2	RIL*+YQLLY	YSGSYY
	2-8		RILY*WCMLY	DIVVVPAAI
	2-15		RIL*WW*LLL	DIVLMVYAI
	2-21		SILWW*LLF	DIVVVVAAT
D3	3-3	RF 2	VLREFEWLLY	HIVVVTAI
	3-9		VLRYEDWLL*	ITIEGVVII
	3-10		VLLWFELL*	ITIE*LVII
	3-16		VL*TRLGELSLY	ITMVRGVII
	3-22		VLL*+*WLLL	IMITEGGVIVI
D4	4-4	RF 2	*LQ*L	ITMIVVVIT
	4-11		*LQ*L	TTVT
	4-17		*LR*L	TTVT
	4-23		*LRW*L	TTVVVT

Figura 1 (continuación)

D5	5-5	VDTAMV	WIQLWL	GYSYGY
	5-12	VDIVATI	WI*WLRL	GYSGYDY
	5-18	VDTAMV	WIQLWL	GYSYGY
	5-24	VEMATI	*RWLQL	RDGYN Y
D6	6-6	EYSSSS	SIAAR	V*QLV
	6-13	GYSSSWY	GIAAAG	V*QQLV
	6-19	GYSSGKY	GIAVAG	V*QWLV
D7	7-27	LTG	*LG	NWG

CDR3

	100	110
JH1	---	-AEYFQHMGQGTTLVTVSS
JH2	---	-YWWYFDLWGRGTTLVTVSS
JH3	---	-AFDIWQGQGTMTVTVSS
JH4	---	-YFDYMGQGTTLVTVSS
JH5	---	-NWEDPMWGQGTTLVTVSS
JH6	---	YYYYGMDDVWQGTIVTVSS

Figura 1 (continuación)

			FR1	FR2	CDR1			
			1	2	3	4		
VKI	L1-L2-L3	locus	12345678901234567890123	45678901abcde f 234	567890123456789			
	2-1-(1)	012	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISS-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY			
	2-1-(1)	02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISS-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY			
	2-1-(1)	018	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	QASQDISN-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY			
	2-1-(1)	08	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	QASQDISN-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY			
	2-1-(U)	A20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISN-----YLA	WYQQKPGKVPKLLIY			
	2-1-(1)	A30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGIRN-----DLG	WYQQKPGKAPKRLIY			
	2-1-(1)	L14	NIQMTQSPSSMSASVGDRVTITC	RARQGISN-----YLA	WFQQKPGKVPKHLIY			
	2-1-(1)	L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISN-----YLA	WFQQKPGKAPKSLLIY			
	2-1-(1)	L15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISS-----WLA	WYQQKPEKAPKSLLIY			
	2-1-(1)	J4	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISS-----ALA	WYQQKPGKAPKLLIY			
	2-1-(1)	L18	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISS-----ALA	WYQQKPGKAPKLLIY			
	2-1-(1)	L5	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC	RASQGISS-----WLA	WYQQKPGKAPKLLIY			
	2-1-(1)	L19	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC	RASQGISS-----WLA	WYQQKPGKAPKLLIY			
	2-1-(1)	L8	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC	RASQGISS-----YLA	WYQQKPGKAPKLLIY			
	2-1-(1)	L23	AIRMTQSPSESLASVGDRVTITC	WASQGISS-----YLA	WYQQKPAKAPKLFY			
	2-1-(1)	L9	AIRMTQSPSESESASTGDRVTITC	RASQGISS-----YLA	WYQQKPGKAPKLLIY			
	U-1-(1)	L24	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTIS	RMSQGISS-----YLA	WYQQKPGKAPELLIIY			
	2-1-(1)	L11	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGIRN-----DLG	WYQQKPGKAPKLLIY			
	2-1-(U)	L12	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASQSISS-----WLA	WYQQKPGKAPKLLIY			

Figura 1 (continuación)

VKII	3-1-(1)	O11	DIVMTQTPLSLPVTPEPASISC	RSSQSLLDDDGNTYLD
	3-1-(1)	O1	DIVMTQSPPLSLPVTPEPASISC	RSSQSLLDSDDGNTYLD
	4-1-(1)	A17	DVVMTOQSPPLSLPVTLQPASISC	RSSQSLVYS-DGNTYLN
	4-1-(1)	A1	DVVMTOQSPPLSLPVTLQPASISC	RSSQSLVYS-DGNTYLN
	4-1-(1)	A18	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	KSSQSLLHS-DGKTYLY
	4-1-(1)	A2	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	KSSQSLLHS-DGKTYLY
	4-1-(1)	A19	DIVMTQSPPLSLPVTPEPASISC	RSSQSLLHS-NGYNYLD
	4-1-(1)	A3	DIVMTQSPPLSLPVTPEPASISC	RSSQSLLHS-NGYNYLD
	4-1-(1)	A23	DIVMTQTPLSSPVTLQPASISC	RSSQSLVHS-DGNTYLS
	6-1-(1)	A27	DIVMTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSVSSS-----YLA
VKIII	6-1-(1)	A11	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSC	GASQSVSSS-----YLA
	2-1-(1)	L2	EIVMTQSPATLSSVSPGERATLSC	RASQSVSSS-----NLA
	2-1-(1)	L16	EIVMTQSPATLSSVSPGERATLSC	RASQSVSSS-----NLA
	2-1-(1)	L6	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSC	RASQSVSSS-----YLA
	2-1-(1)	L20	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSC	RASQGVSS-----YLA
	6-1-(1)	L25	EIVMTQSPATLSSLSPGERATLSC	RASQSVSSS-----YLS
	3-1-(1)	B3	DIVMTQSPDSLAVSGERATINGC	KSSQSVLSSNNKNYL
	2-1-(1)	B2	ETTLTOSPAFMSATPGDKVNISC	KASQDIDD-----DMN
	2-1-(1)	A26	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVITC	WYQQKPDQSPKLLIK
	2-1-(1)	A10	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVITC	WYQQKPDQSPKLLIK
VKIV	2-1-(1)	A14	DVVMTOQSPAFLSVTPEKVTITC	WYQQKPDQAPKLLIK

Figura 1 (continuación)

		CDR2	FR3	CDR3
	Locus	5	6	7
VKI	2-1-(1)	012	78901234567890123456789012345678	9
	2-1-(1)	02	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQSYSTP</u>
	2-1-(1)	018	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQSYSTP</u>
	2-1-(1)	08	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQYDNLP</u>
	2-1-(U)	A20	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQYDNLP</u>
	2-1-(1)	A30	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QKYNsap</u>
	2-1-(1)	A30	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>LQHNSYP</u>
	2-1-(1)	L14	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>LQHNSYP</u>
	2-1-(1)	L1	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQYNSYP</u>
	2-1-(1)	L15	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQYNSYP</u>
	2-1-(1)	L4	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQFNSYP</u>
	2-1-(1)	L18	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQFNSYP</u>
	2-1-(1)	L5	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQANSEF</u>
	2-1-(1)	L19	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQANSEF</u>
	2-1-(1)	L8	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQLNSYP</u>
	2-1-(1)	L23	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>QQYYSTP</u>
	2-1-(1)	L9	GVPSRFSGSGSGTDFLTISCLQSEDFAATYYC	<u>QQYYSTP</u>
	U-1-(1)	L24	GVPSRFSGSGSGTDFLTISCLQSEDFAATYYC	<u>QQYYSEF</u>
	2-1-(1)	L11	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	<u>LQDYNYP</u>
	2-1-(U)	L12	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPDDEFAATYYC	<u>QQYNSYS</u>

Figura 1 (continuación)

VKII	3-1-(1)	011	TLSYRAS	GVPDRES <u>GGSGGT</u> DFTLKISRVEAEDVGYYC	MQRIEFP
	3-1-(1)	01	TLSYRAS	GVPDRES <u>GGSGGT</u> DFTLKISRVEAEDVGYYC	MQRIEFP
	4-1-(1)	A17	KVSNRDS	GVPDRES <u>GGSGGT</u> DFTLKISRVEAEDVGYYC	MQGTHWP
	4-1-(1)	A1	KVSNWDS	GVPDRES <u>GGSGGT</u> DFTLKISRVEAEDVGYYC	MQGTHWP
	4-1-(1)	A18	EVSSRES	GVPDRES <u>GGSGGT</u> DFTLKISRVEAEDVGYYC	MQGIHLP
	4-1-(1)	A2	EVSNRFS	GVPDRES <u>GGSGGT</u> DFTLKISRVEAEDVGYYC	MQSQQLP
	4-1-(1)	A19	LGSNRAS	GVPDRES <u>GGSGGT</u> DFTLKISRVEAEDVGYYC	MQALQTP
	4-1-(1)	A3	LGSNRAS	GVPDRES <u>GGSGGT</u> DFTLKISRVEAEDVGYYC	MQALQTP
	4-1-(1)	A23	KISNRFS	GVPDRES <u>GGSGGT</u> DFTLKISRVEAEDVGYYC	MQATQFP
	6-1-(1)	A27	GASSRAT	GIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSPP
VKIII	6-1-(1)	A11	DASSRAT	GIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSPP
	2-1-(1)	L2	GASTRAT	GIPAREFGSGGTETLTISSLEPEDFAVYYC	QQYNNWP
	2-1-(1)	L16	GASTRAT	GIPAREFGSGGTETLTISSLEPEDFAVYYC	QQYNNWP
	2-1-(1)	L6	DASN RAT	GIPARFSGSGGTDFTLTISLQSEDFAVYYC	QQRSNWP
	2-1-(U)	L20	DASN RAT	GIPARFSGSGGTDFTLTISLQSEDFAVYYC	QQRSNWP
	6-1-(1)	L25	GASTRAT	GIPARFSGSGGTDFTLTISLQSEDFAVYYC	QQDYNLP
	3-1-(1)	B3	WASTRES	GVPDRFSGSGGTDFTLTISLQAEDVAVYYC	QQYYSTP
	2-1-(1)	B2	EATLVP	GIPPRESGGGYGTDFTLTINNIESDAAYYFC	LQHDNFP
	2-1-(1)	A26	YASQSES	GVPRESGGSGGTDFTLTINSLEADEAATYYC	HQSSSLP
	2-1-(1)	A10	YASQSF S	GVPRESGGSGGTDFTLTINSLEADEAATYYC	HQSSSLP
	2-1-(1)	A14	YASQSI S	GVPRESGGSGGTDFTLTINSLEADEAATYYC	QQGNKHP

Figura 1 (continuación)

L3	CDR3	FR1	CDR1	FR2
---	100	---	---	4
JK1	WTFGQGT K VEIK	1234567891234567890123	45678901abc234	567890123456789
JK2	YTFGQGT K LEIK	QSVLTOPPSVSEAPRQRVTISC	SGSSSNIGNN-AVN	WYQQLPG K APKLLIY
JK3	FTFGP G T K VDIK	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC	TGSSSNIGAGYDVH	WYQQLPG T APKLLIY
JK4	LTFFGGT K VEIK	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	SGSSSNIGSN-TVN	WYQQLPG T APKLLIY
JK5	ITFGQGT R LEIK	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	SGSSSNIGSN-YVY	WYQQLPG T APKLLIY
CDR1-2	Locus	QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISC	SGSSSNIGNN-YVS	WYQQLPG T APKLLIY
13-7 (A)	1a	QSVLTQPPSASGSPGQSVTISC	TGTSSDVGGNYVS	WYQQHPG K APKLMIY
14-7 (A)	1e	QSVLTQPPSASGSPGQSVTISC	WYQQHPG K APKLMIY	WYQQHPG K APKLMIY
13-7 (A)	1c	QSVLTQPPSASGSPGQSVTISC	WYQQHPG K APKLMIY	WYQQHPG K APKLMIY
13-7 (A)	1g	QSVLTQPPSASGSPGQSVTISC	WYQQHPG K APKLMIY	WYQQHPG K APKLMIY
13-7 (A)	1b	QSVLTQPPSASGSPGQSVTISC	WYQQHPG K APKLMIY	WYQQHPG K APKLMIY
14-7 (A)	2c	QSVLTQPPSASGSPGQSVTISC	WYQQHPG K APKLMIY	WYQQHPG K APKLMIY
14-7 (A)	2e	QSVLTQPPSASGSPGQSVTISC	WYQQHPG K APKLMIY	WYQQHPG K APKLMIY
14-7 (A)	2a2	QSVLTQPPSASGSPGQSVTISC	WYQQHPG K APKLMIY	WYQQHPG K APKLMIY
14-7 (A)	2d	QSVLTQPPSASGSPGQSVTISC	WYQQHPG K APKLMIY	WYQQHPG K APKLMIY
14-7 (A)	2b2	QSVLTQPPSASGSPGQSVTISC	WYQQHPG K APKLMIY	WYQQHPG K APKLMIY

Figura 1 (continuación)

VL3	11-7	3r	SYELTQPPSVSVPQGOTASITC	SG-DK-LGDK-YAC	WYQQKPGQOSPVLVLY
	11-7	3j	SYELTQPLSVSVALGQTARITC	GG-NN-IGSK-NVH	WYQQKPGQAPVLVLY
	11-7	3p	SYELTQPPSVSVPQGOTARITC	SG-DA-LPKK-YAY	WYQQKSGQAPVLVLY
	11-7	3a	SYELTQPPSVSLSQMARIITC	SG-EA-LPKK-YAY	WYQQKPGQFPVLVLY
	11-7	31	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC	QG-DS-LRSY-YAS	WYQQKPGQAPVLVLY
	11-7	3h	SYVLTQPPSVSVPAGKTARITC	GG-NN-IGSK-SVH	WYQQKPGQAPVLVLY
	11-7	3e	SYELTQLPSVSVSPGQTARITC	SG-DV-LGEN-YAD	WYQQKPGQAPELVLVY
	11-7	3m	SYELM_QPPSVSVPQGOTARITC	SG-DA-LPKQ-YAY	WYQQKPGQAPVLVLY
	11-7	2-19	SYELTQPPSVSVPQGOTARITC	SG-DV-LAKK-YAR	WFQQKPGQAPVLVLY
	12-11	4c	LPVLTQPPSASALLGASIRLTC	TLSSEHSTY--TIE	WYQQRPGRSPOYIMK
VL4	12-11	4a	QPVLQTQSSASASLGSSVNLTC	TLSSEGHSSY--IIA	WHQQQPGKGAPRYLMK
	12-11	4b	QLVLTQPSASASLGASVNLTC	TLSSEGHSSY--AIA	WHQQQPEKGPRYLMK
	12-11	5e	QPVLQTQPSASSPGESESARLTC	TLPSDINVGSNTY	WYQQKPGSSPPRYLLY
	14-11	5c	QAVLTQPAASASPGASASLTC	TIRSGINVGTYRILY	WYQQKPGSSPPQYLIR
	14-11	5b	QPVLQTQPSHSASSGASVRLTC	MSSGFSSVGDFWIR	WYQQKPGNNPPRYLLY
	14-11	6a	NFMLTQPHSVSESPGKTVTIIS	TRSSGSIASN-YVQ	WYQQRPGSSPTTVLY
	14-7 (B)	7a	QTVVVTQEPPLTVSPGGTVTLTC	ASSTGAVTSGYYPN	WFQQKPGQAPRALITY
	14-7 (B)	7b	QAVVVTQEPPLTVSPGGTVTLTC	GSSTGAVTSGHYPY	WFQQKPGQAPRTLLY
	14-7 (B)	8a	QTVVVTQEPSESVSPGGTVTLTC	GLSSGSVSTSYYPS	WYQQTPGQAPRTLLY
	12-12	9a	QPVLQTQPPSASASLGASVTLTC	TLSSEGYSNY--KVD	WYQQRPGKGPRFVMR
VL5	13-7 (C)	10a	QAGLTQPPSVPSSRGRLQTTATLTC	TGNSSNNVGNO-GAA	WLQQHQGHPPKLLSY

Figura 1 (continuación)

		CDR2	FR3	CDR3
VL1	CDR1-2	5	6	9
	13-7 (A)	Locus	7	8
	1a	01abcde23456	789012345678ab90123456789012345678	9012345abcde
	1e	YD-----DLIPS	GVSDRESGSKSG--TSASLAISGLOSEDEADYYC	AAWDDSLNG
	13-7 (A)	GN-----SNRPS	GVPDRESGSKSG--TSASLAITGLQAEDADYYC	QSYDSSLG
	1c	SN-----NQRPS	GVPDRESGSKSG--TSASLAISGLOSEDEADYYC	AAWDDSLNG
	13-7 (A)	RN-----NQRPS	GVPDRESGSKSG--TSASLAISGIRSEDEADYYC	AAWDDSLSG
	1g	DN-----NKRPSS	GIPDRESGSKSG--TSATLGITGLQTGDEADYYC	GTWDDSLSA
	1b	EV-----SKRPS	GVPDRESGSKSG--NTASLTVTSGLQAEDADYYC	SSYAGSNNF
	13-7 (A)	DV-----SKRPS	GVPDRESGSKSG--NTASLTISGLOAQEDEADYYC	CSYAGSYTF
	2c	EV-----SNRPS	GVSNRESGSKSG--NTASLTISGLQAEDADYYC	SSYTSSSTL
	14-7 (A)	EV-----SNRPS	GVPDRESGSKSG--NTASLTISGLOAQEDEADYYC	SLYTSSSTF
	2e	EV-----SKRPS	GVSNRESGSKSG--NTASLTISGLOAQEDEADYYC	CSYAGSSTE
	14-7 (A)	QD-----SKRPS	GIPERFSGNSNG--NTATLTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTA
	2a2	RD-----SNRPS	GIPERFSGNSNG--NTIATLTISRAQAGDEADYYC	QWWDSTA
	2d	EV-----SNRPS	GIPERFSGSSG--NTMATTISGAQVEDADYYC	YSTDSSGNH
	14-7 (A)	EV-----SKRPS	GIPERFSGSSG--NTMATTISGAQVEDADYYC	LSADSSGTY
	2b2	ED-----SERPS	GIPERFSGSSG--NTIATLTISGTQAMDEADYYC	NRDSSGNH
	11-7	KD-----SERPS	GIPERFSGSSG--TIVTLTISGVQAEDEADYYC	OWWDSSSDH
	3r	GD-----NNRPS	GIPDRESGSSSG--NTASLTITGAQAEDEADYYC	LSGDEDN
	3j	ED-----SERPS	GIPERFSGSSG--NTIATLTISRVEAQDEADYYC	QSADSSGTY
	11-7	3p	GIPERFSGSSG--NTIATLTISRVEAQDEADYYC	YSAADNN
	11-7	3a	ED-----SERPS	GESHTIDGQVG*
	11-7	3l	GIPERFSGSSG--NTIATLTISRVEAQDEADYYC	ETWDSNT
	11-7	3h	ED-----SERPS	QTWGTTGI
	11-7	3e	GIPERFSGSTSG--NTTTLTISRVLTEDEADYYC	
	11-7	3m	GIPERFSGSSG--TTVTLTISGVQAEDEADYYC	
	11-7	2-19	GIPERFSGSSG--TTVTLTISGAQVEDADYYC	
	VL4	12-11	4c	VKS-DGSHSKGD
	12-11	4a	GIPDREMGSSSG--ADRYLTESNLQSDDEAEYHC	
	12-11	4b	LEG-SGSYNKGS	
			GIPDRESGSSG--ADRYLTISNLQLEDEADYYC	
			LNS-DGSHSKGD	

Figura 1 (continuación)

VL5	14-11	5e	YY\$-DSDKGQGS	GVP\$REFSGSKDASANTGILLISGLQSEDEADYYC	MIWPSNAS
	14-11	5c	YKS-DSDKGQGS	GVP\$REFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC	MIWHSAS
VL6	14-11	5b	YHS-DSNKQGGS	GVP\$REFSGSNDA\$ANAGILRISGLQPEDEADYYC	GTWHSNSKT
	13-7 (B)	6a	ED-----NORPS	GVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYC	QSYDSSN
VL7	14-7 (B)	7a	ST-----SNKHS	WTPARFSGSLLG--GKAALTISGVQPEDEAEYYC	LLYGGAQ
	14-7 (B)	7b	DT-----SNKHS	WTPARFSGSLLG--GKAALTISGAQPEDEAEYYC	LLSYSGAR
VL8	14-7 (B)	8a	ST-----NTRSS	GVPDRFSGSLLG--NKAALTITGAQADD\$DYYC	VLYMGGI
	12-12	9a	VGTGGIVGSKGD	GIPDRFSVILSGG--LNRYLTIKNIQEEDES\$DHC	GADHGSGSNFV*
VL10	13-7 (C)	10a	RN-----NNRPS	GISERL S ASRSG--NTASLTITGLQPEDEADYYC	SAWDSSLSA
CDR3					
--					
100					
JL1			YVFGTGT K TVL		
JL2			VVFGGGT K TVL		
JL3			VVFGGGT K TVL		
JL7			AVFGGGTQLTVL		

Figura 1 (continuación)

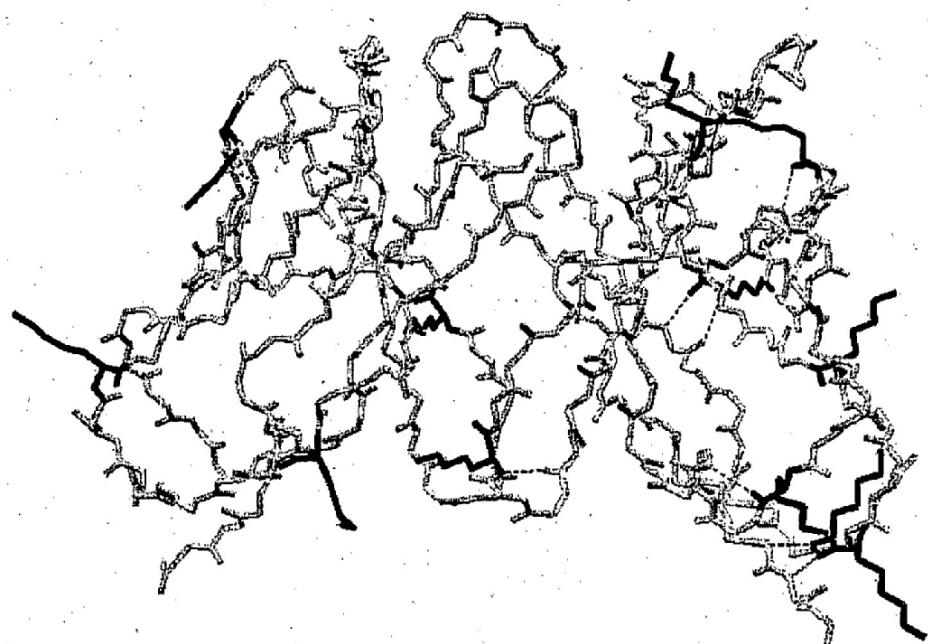


Figura 2

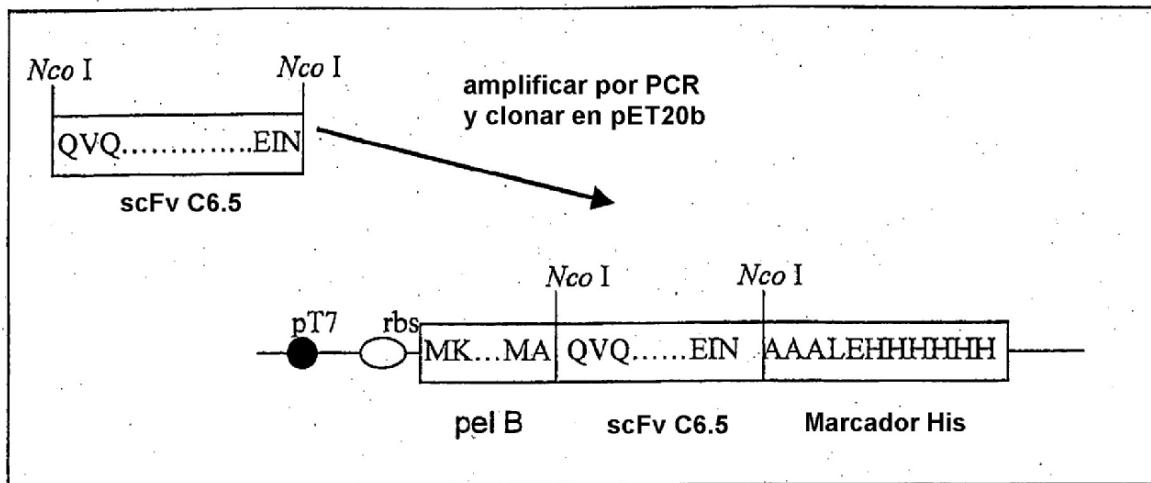


Figura 3

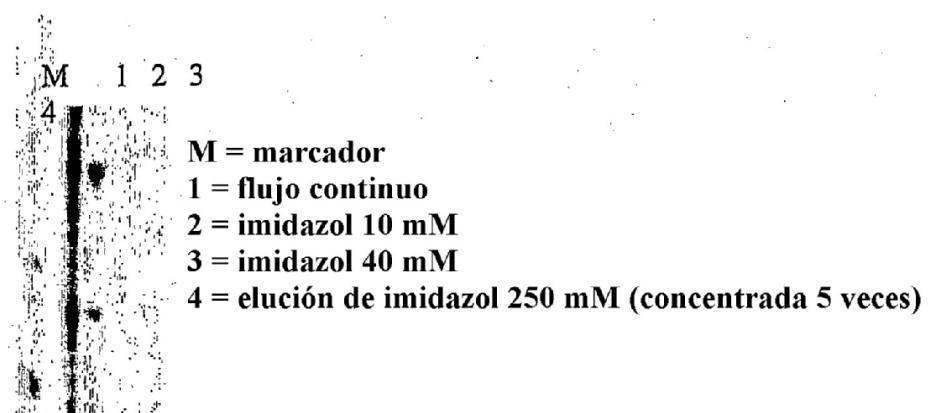


Figura 4

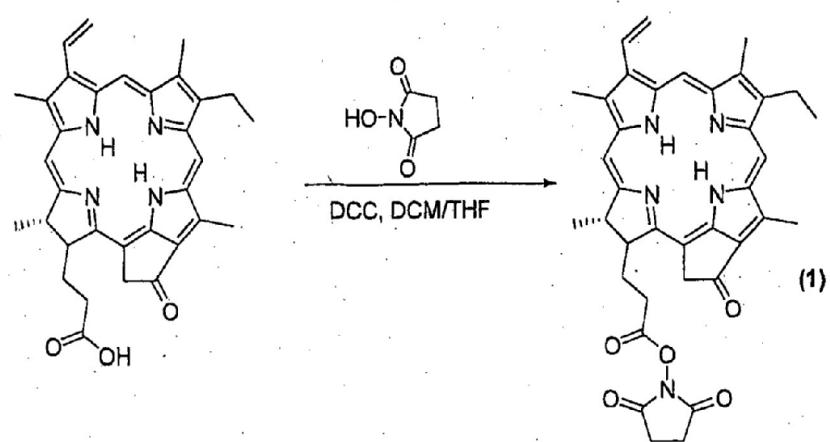


Figura 5

Perfil de absorbancia de C6-ppa y PPa

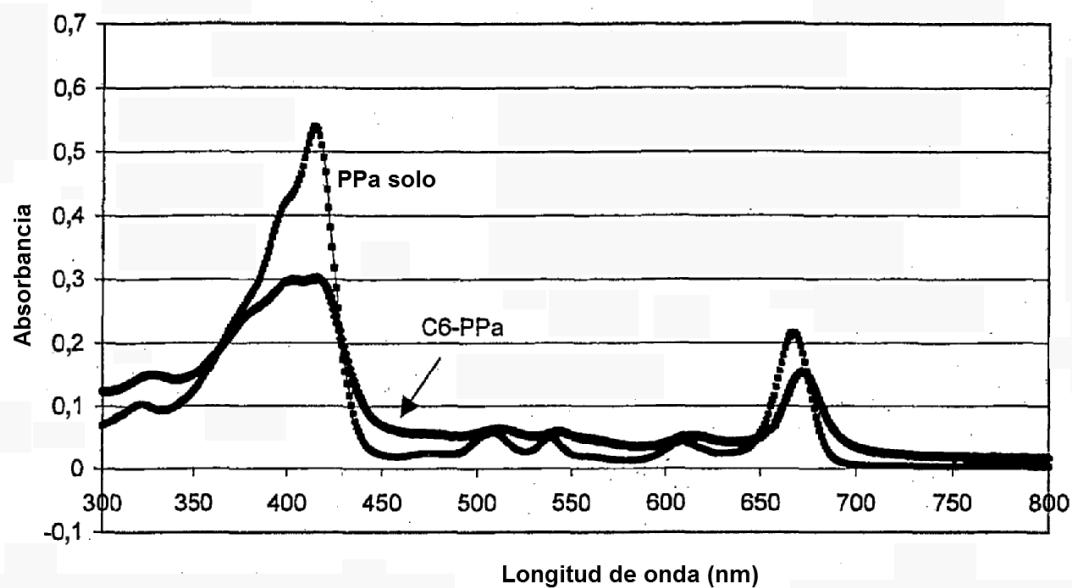
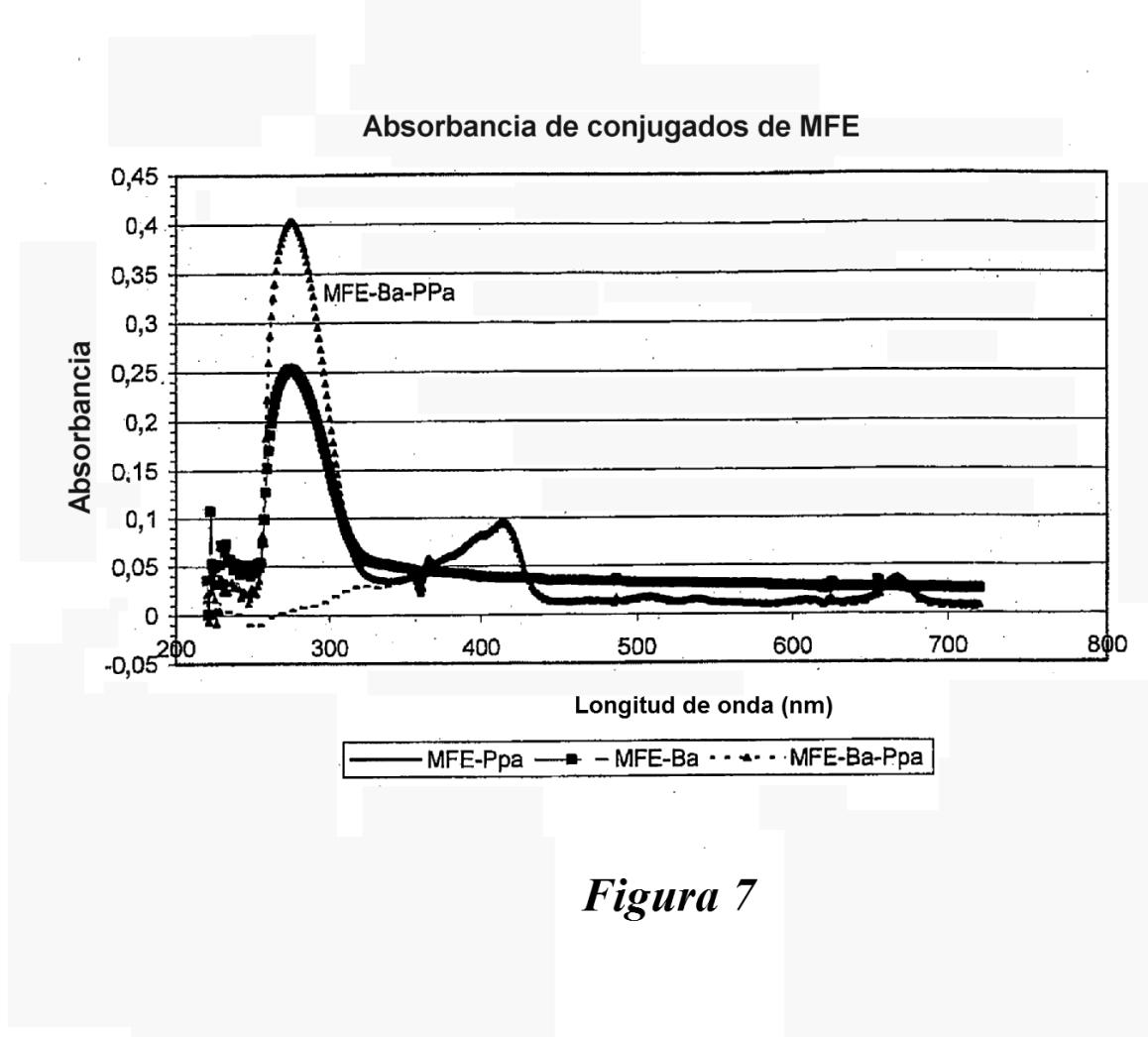


Figura 6



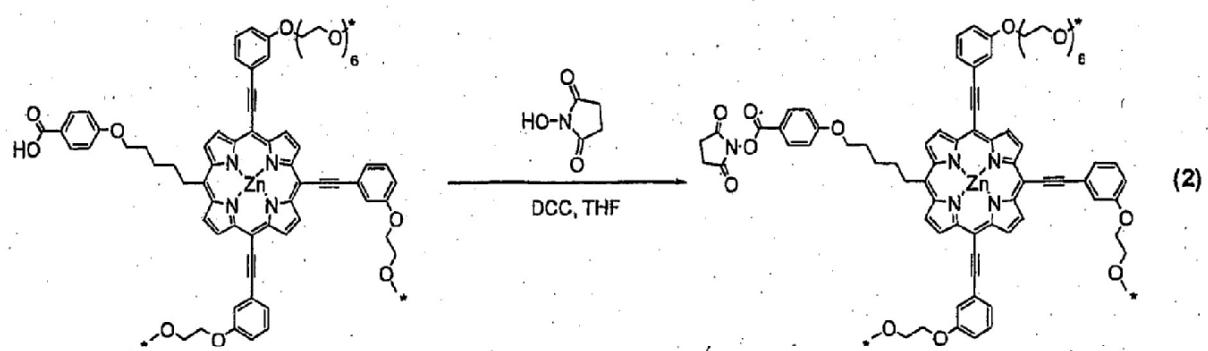
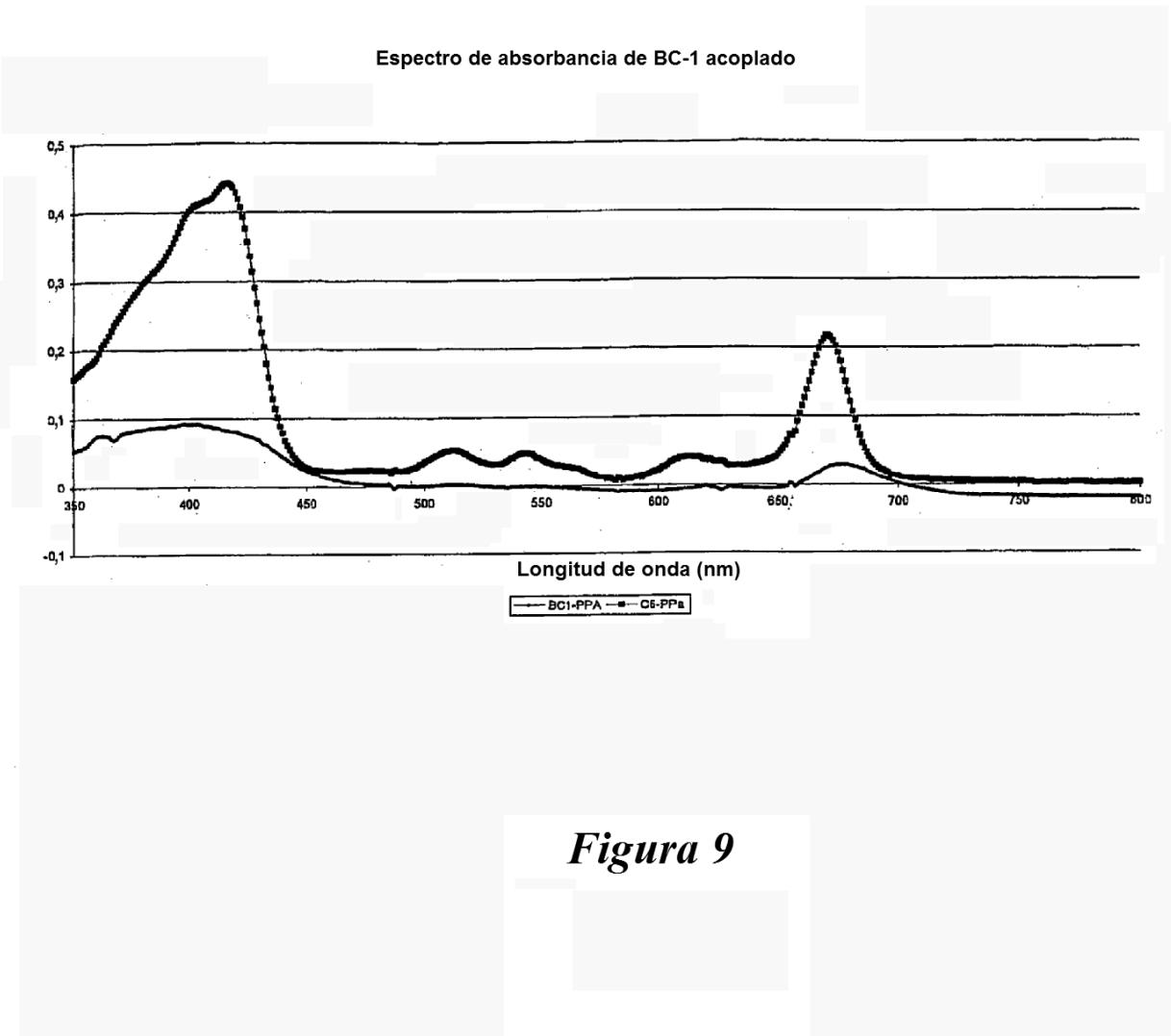
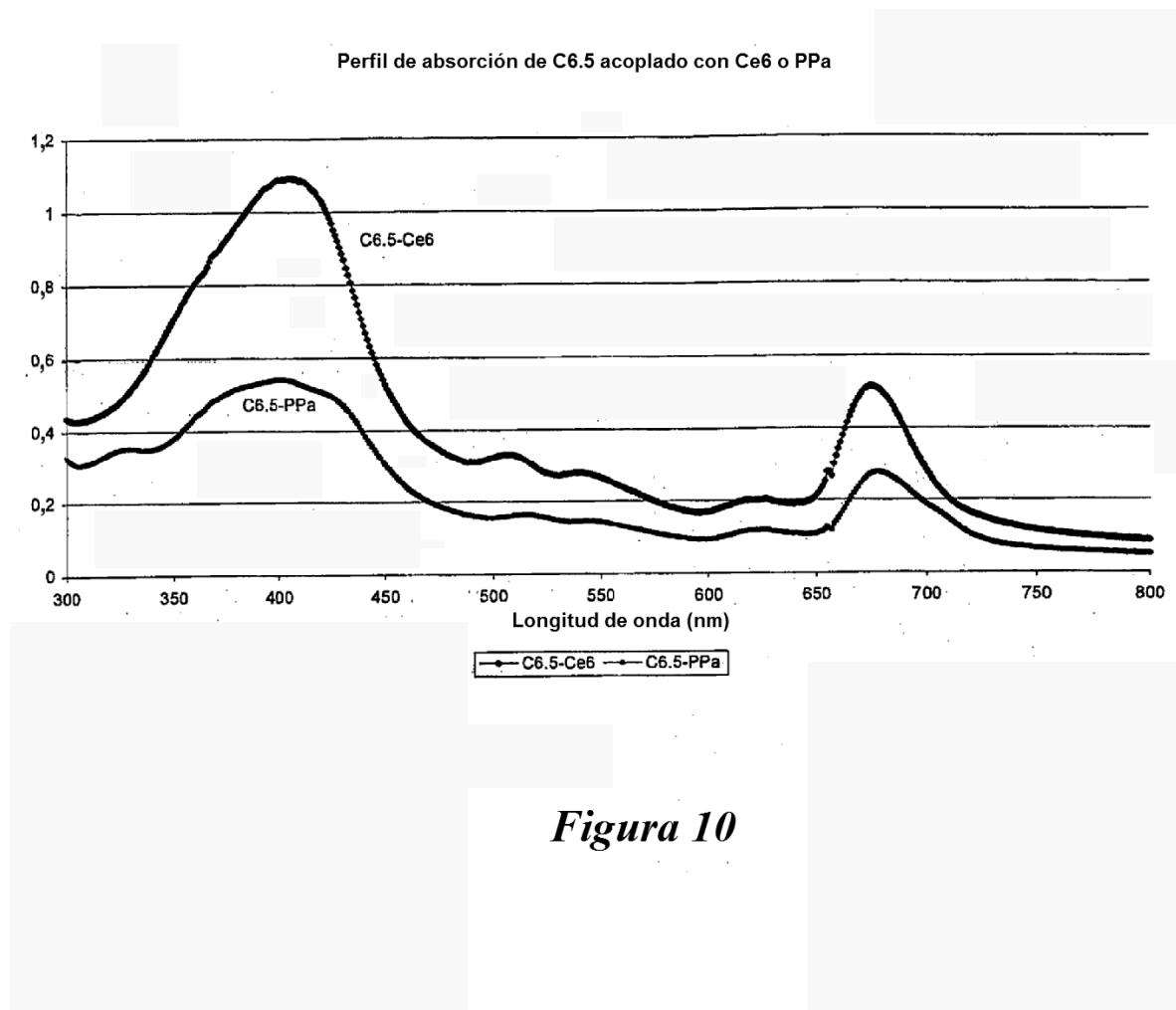


Figura 8





Fluorescencia de fotosensibilizador conjugado con C6 y no conjugado en PBS

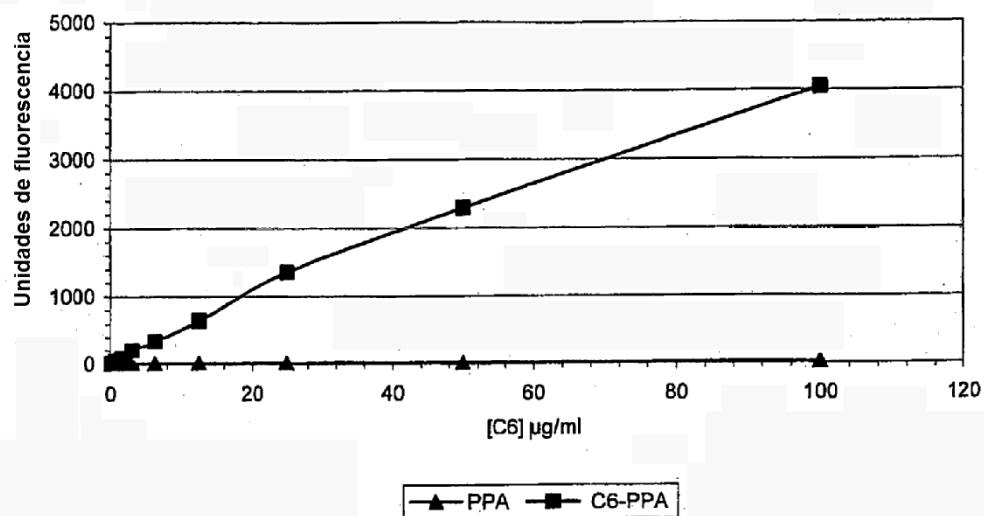


Figura 11

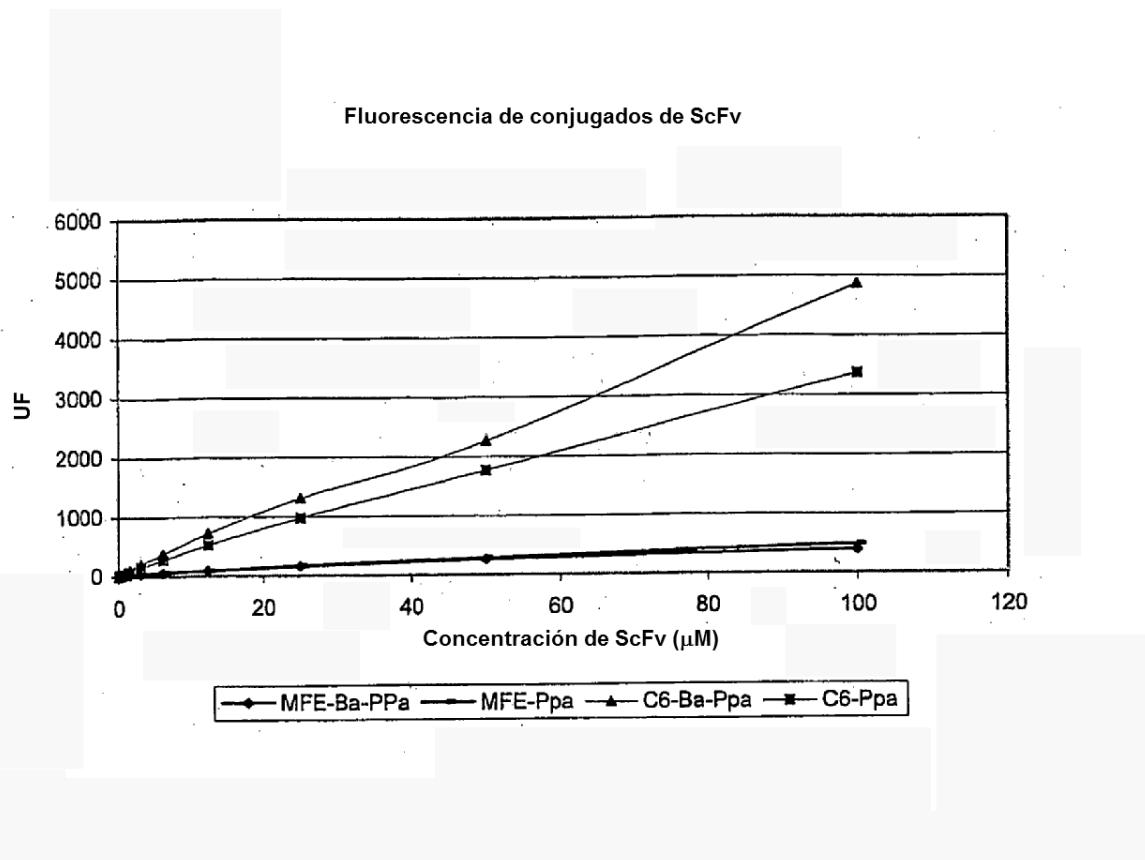


Figura 12

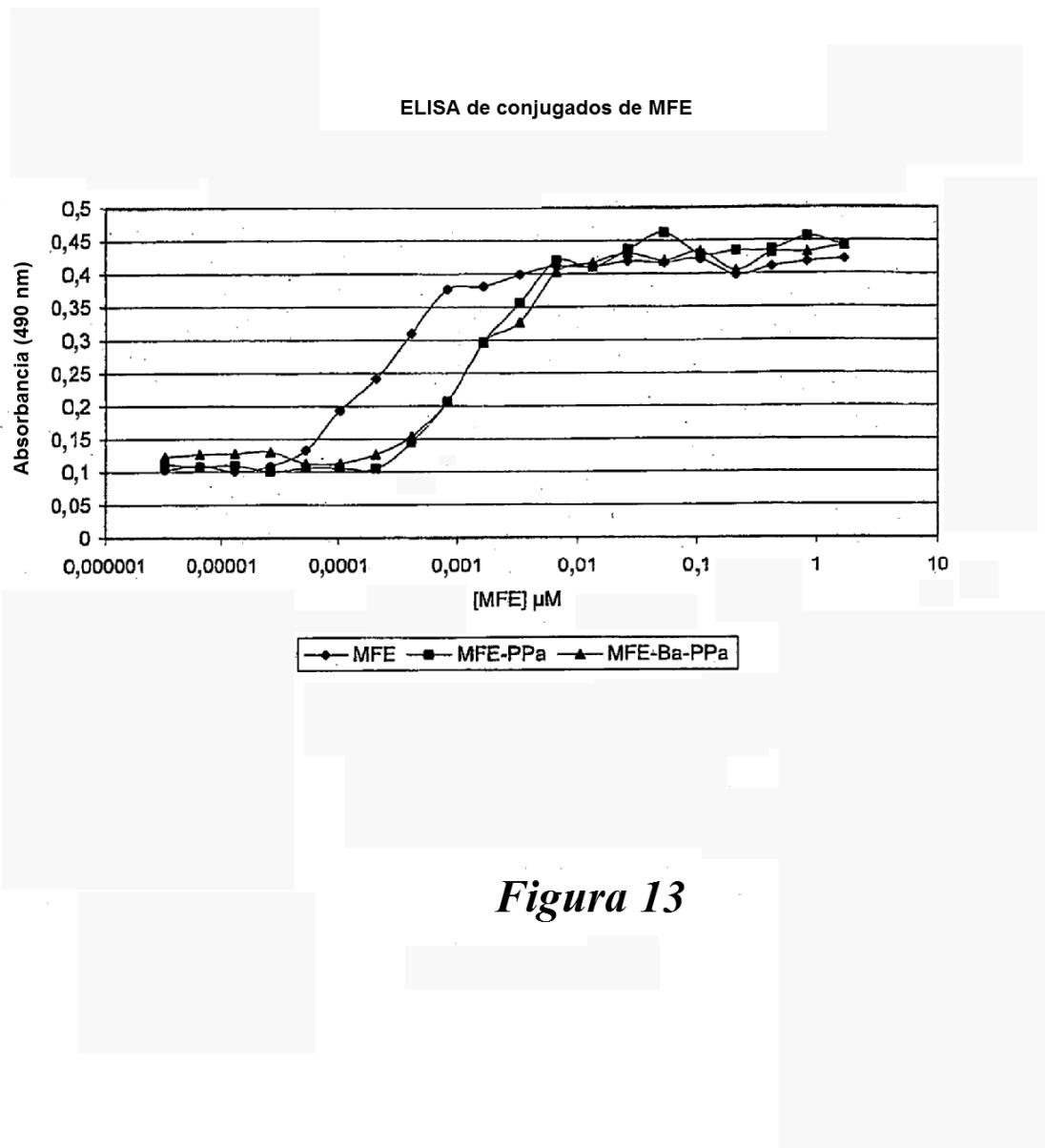


Figura 13

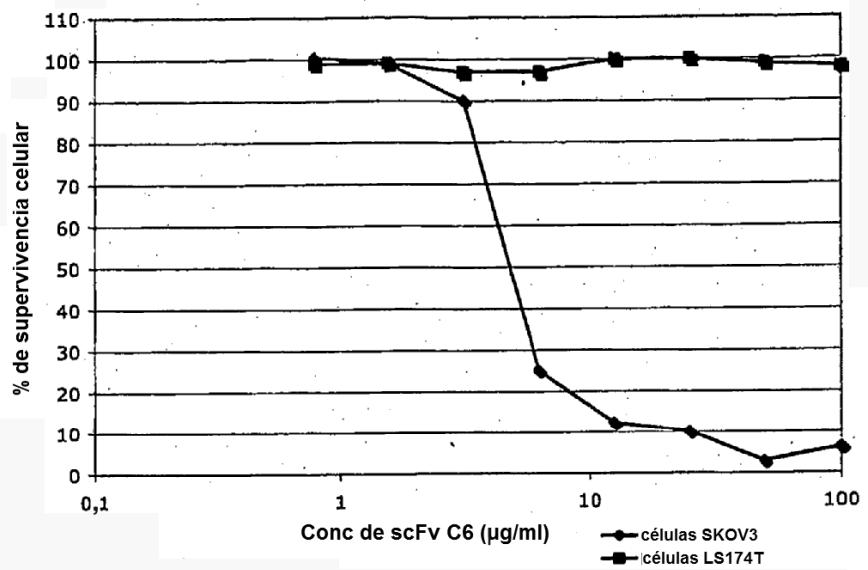


Figura 14

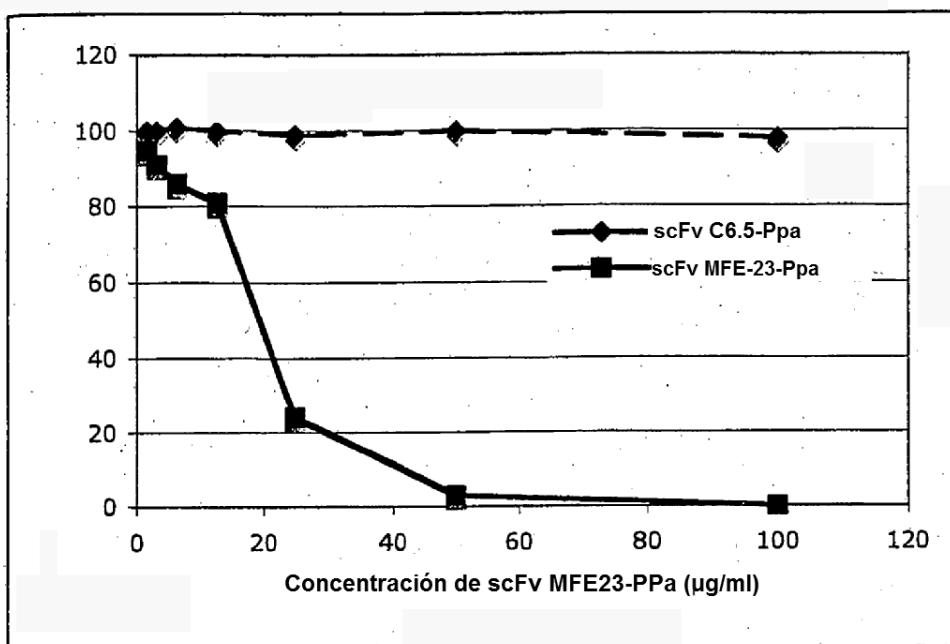
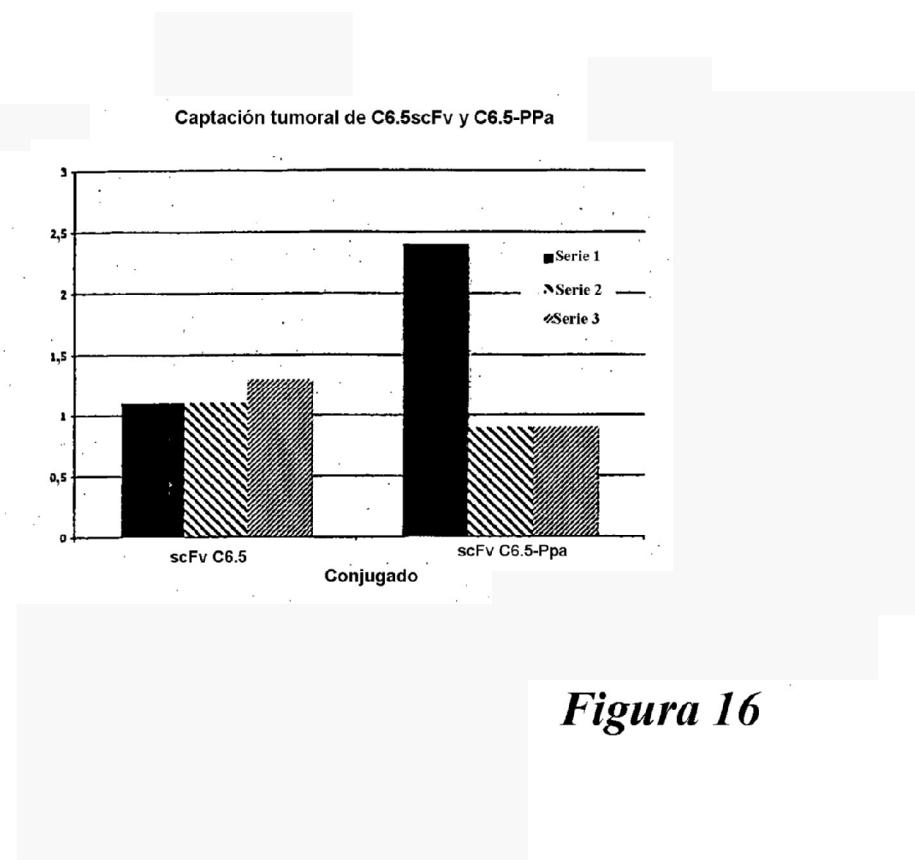


Figura 15



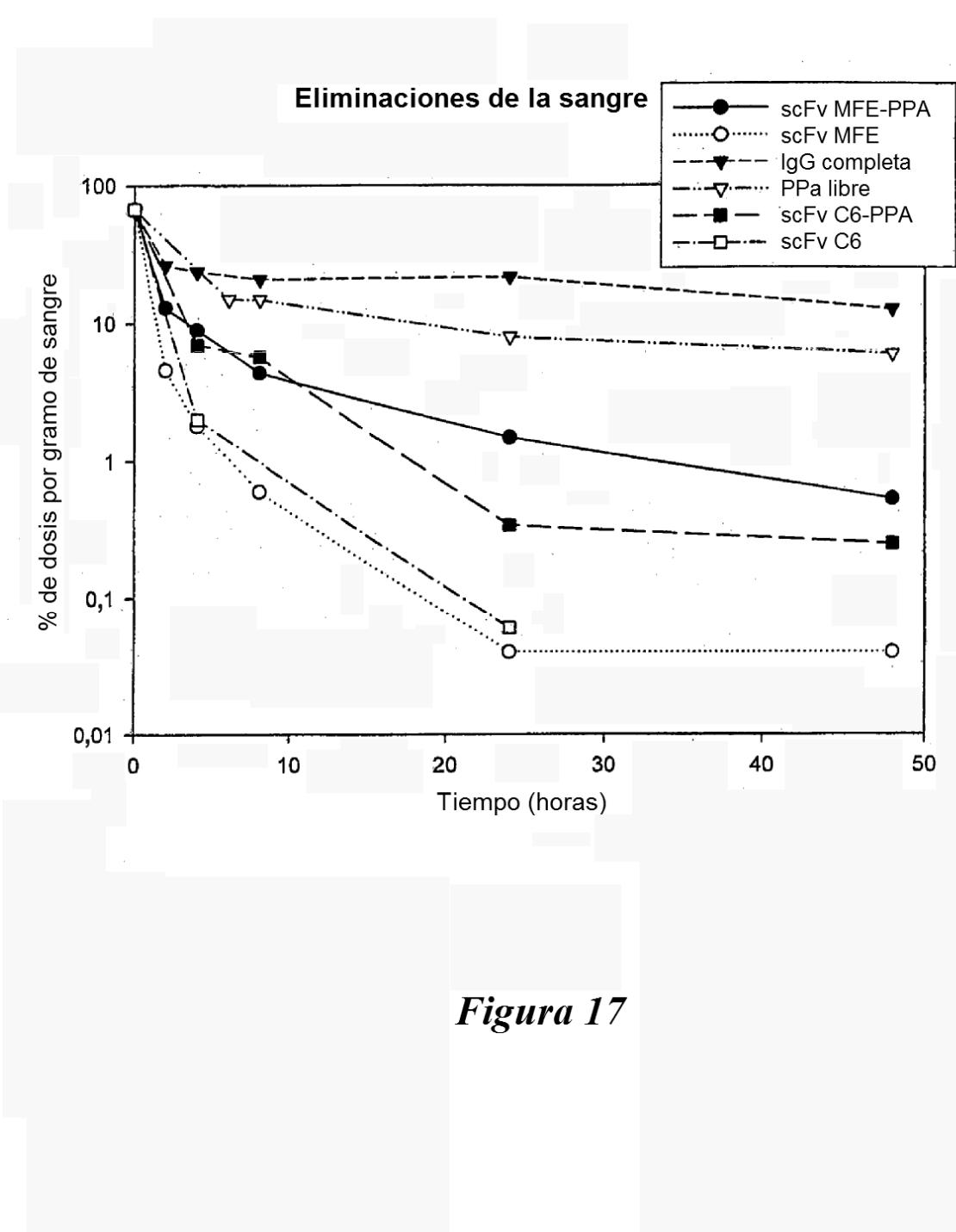


Figura 17



Figura 18

BC-1 EVQLVQSGADV-**K**KPGASV**K**VSK**K**ASGYTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWLGYINPYNDGTQ
 C6.5 QVQLLQSGAEV-**K**KPGESLK**K**ISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMP**K**GLEYMGLIYPGDS**T**K
 BC-1-mut EVQLVQSGADV-**K**QPGASV**K**VSK**K**ASGYTFTNYVMHWVRQAPG**K**GLEWLGYINPYNDGTQ

 BC-1 YNERFKGRVTMTGDT SISTAYMELSRLTSDDTAVYYCAR-EVYG-----NYIWGN
 C6.5 YSPSFQGQVTISVD**K**SVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR-HDVGYCSSSNCA**K**WPEYFQH
 BC-1-mut YNERFKGRVTMTGDT SISTAYMELSRL**K**SDDTAVYYCAR-EVYG-----NYIWGN

 BC-1 WGQGTLVSVSSGGGGGGGGGGSALEIVLTQS-PGTLISLSPGERATLSCSASSS-ISSN
 C6.5 WGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGGSQSVLTQP-P-SVSAAPGQ**K**VTISCGSSSNIGNN
 BC-1-mut WGQGTLVSVSSGGGGGGGGGGSALEIVLTQS-PGTLISLSPGE**K**ATLSCSASSS-ISSN

 BC-1 YLHWYQQKPGQAPRLLIYR---TSNLASGIPDRFSGS--GSGTDFTLTISRLEPEDFAV
 C6.5 YVSWYQQLPGTAP**K**LIIYG---HTNRPAGVPDRFSGS--KSGTSASLAISGFRSEDEAD
 BC-1-mut YLHWYQQKPGQAP**K**LLIYR---TSNLASGIPDRFSGS--KSGTDFTLTISRLEPEDFAV

 BC-1 YYCQQGSS--IPFTFGQGT**K**LEIN
 C6.5 YYCAAWDDSLSGWVFGGGT**K**LTVL
 BC-1-mut YYCQQGSS--IPFTFGQGT**K**LEIN

Figura 19

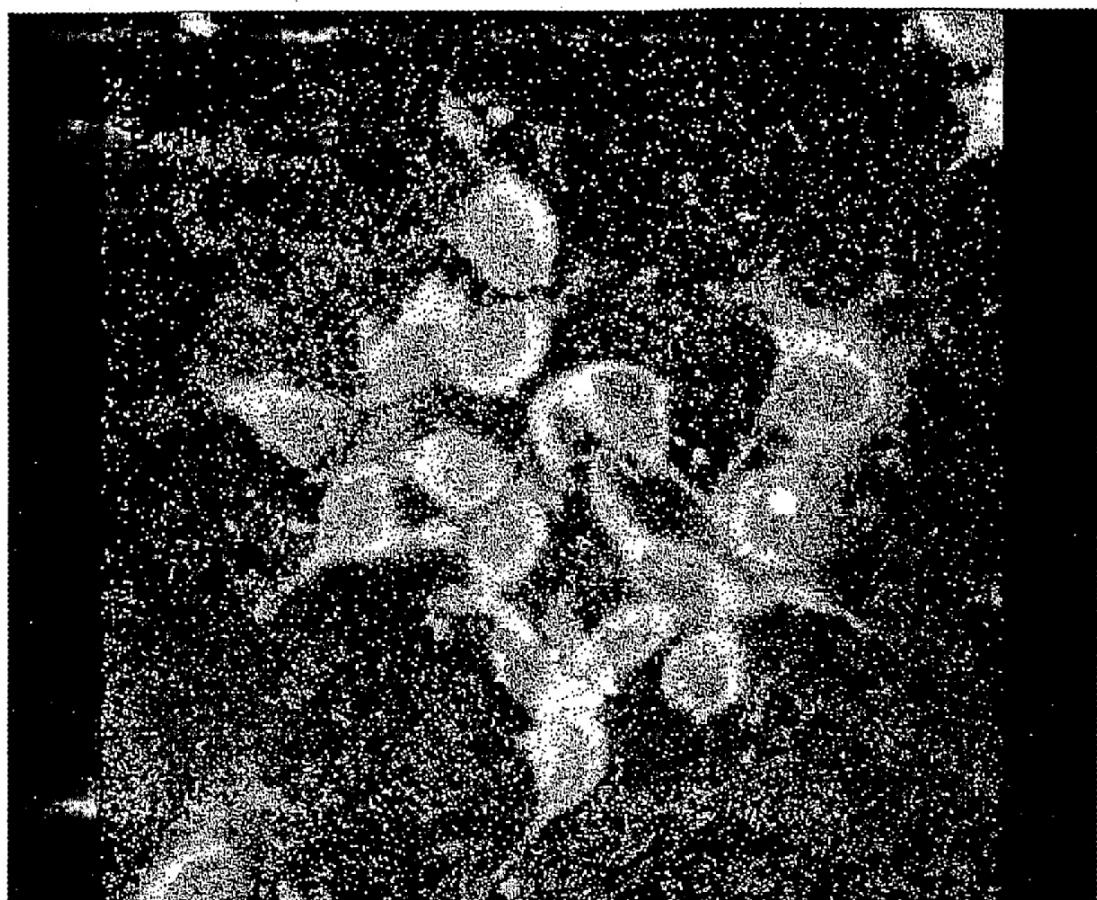


Figura 20

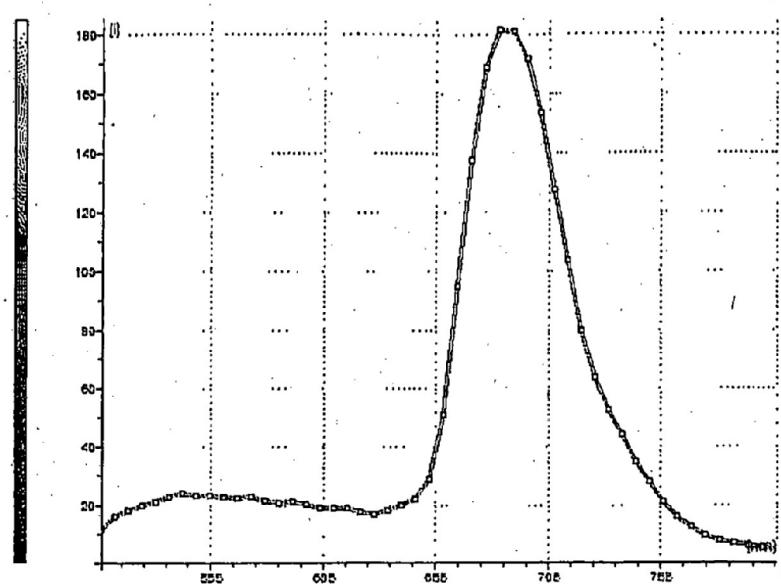


Figura 21

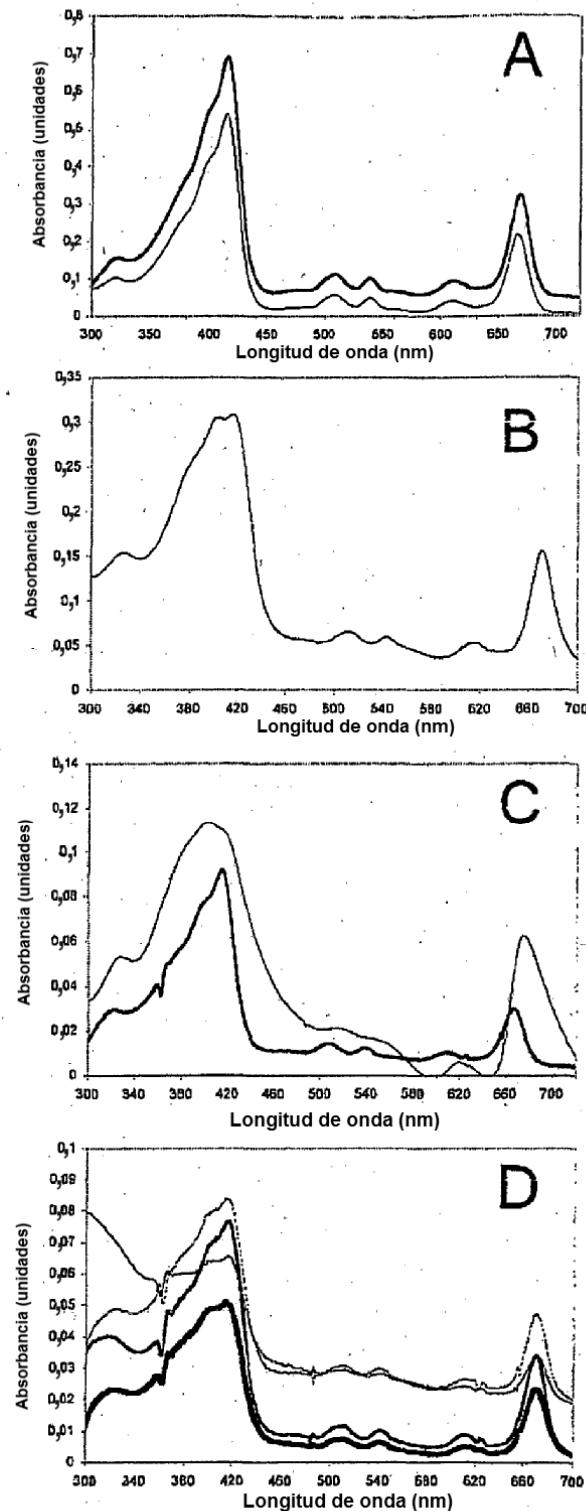


Figura 22

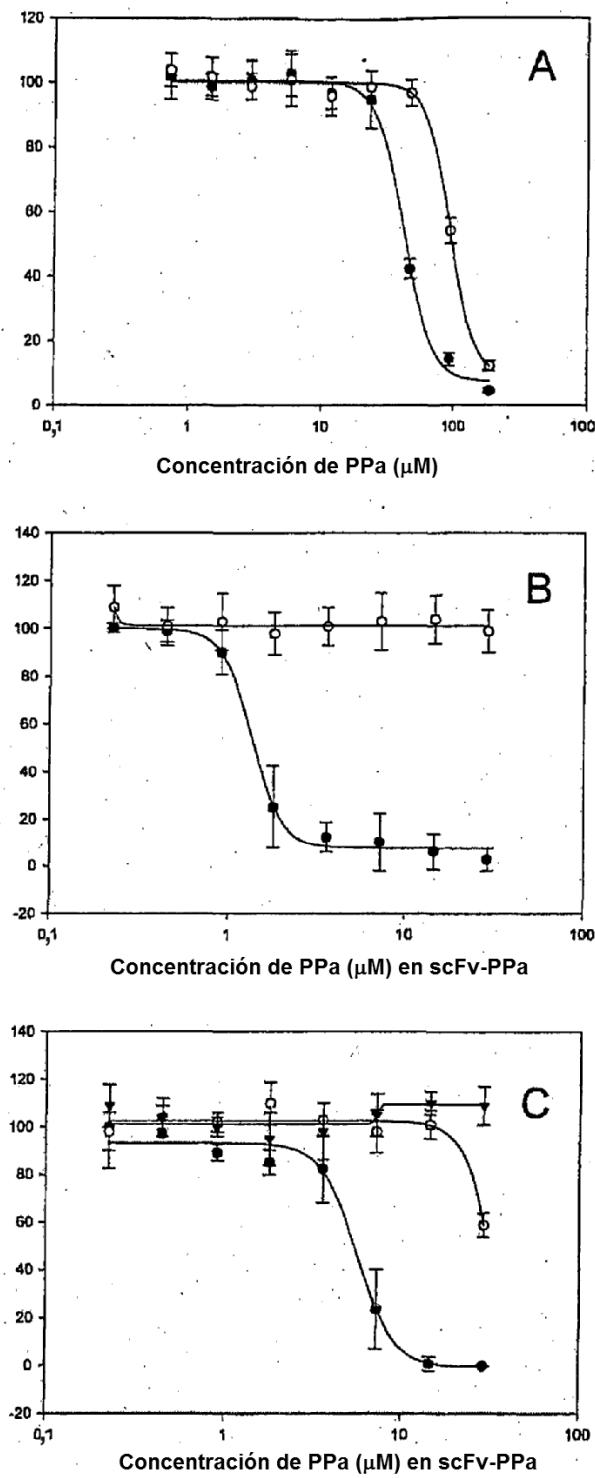


Figura 23

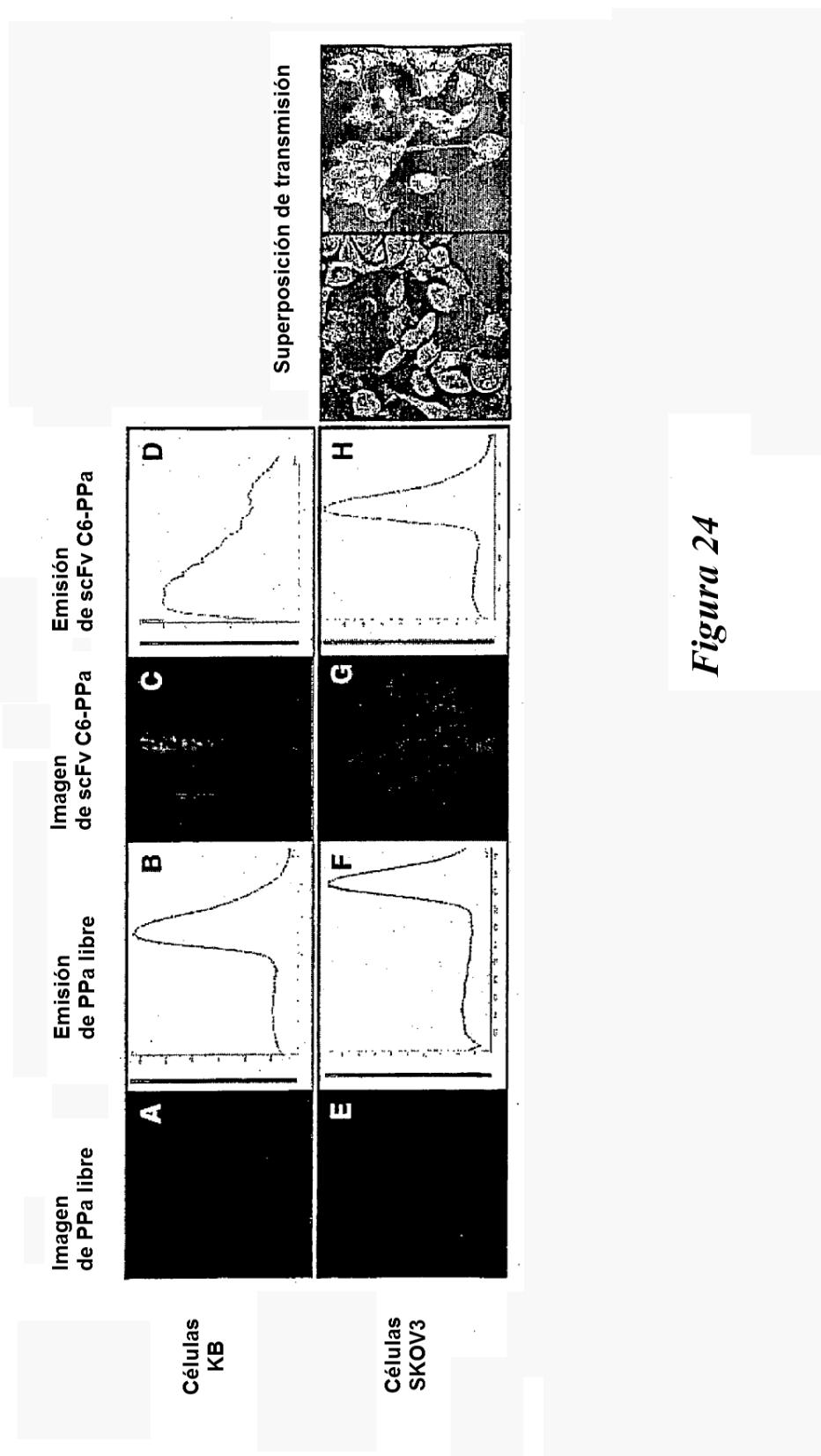
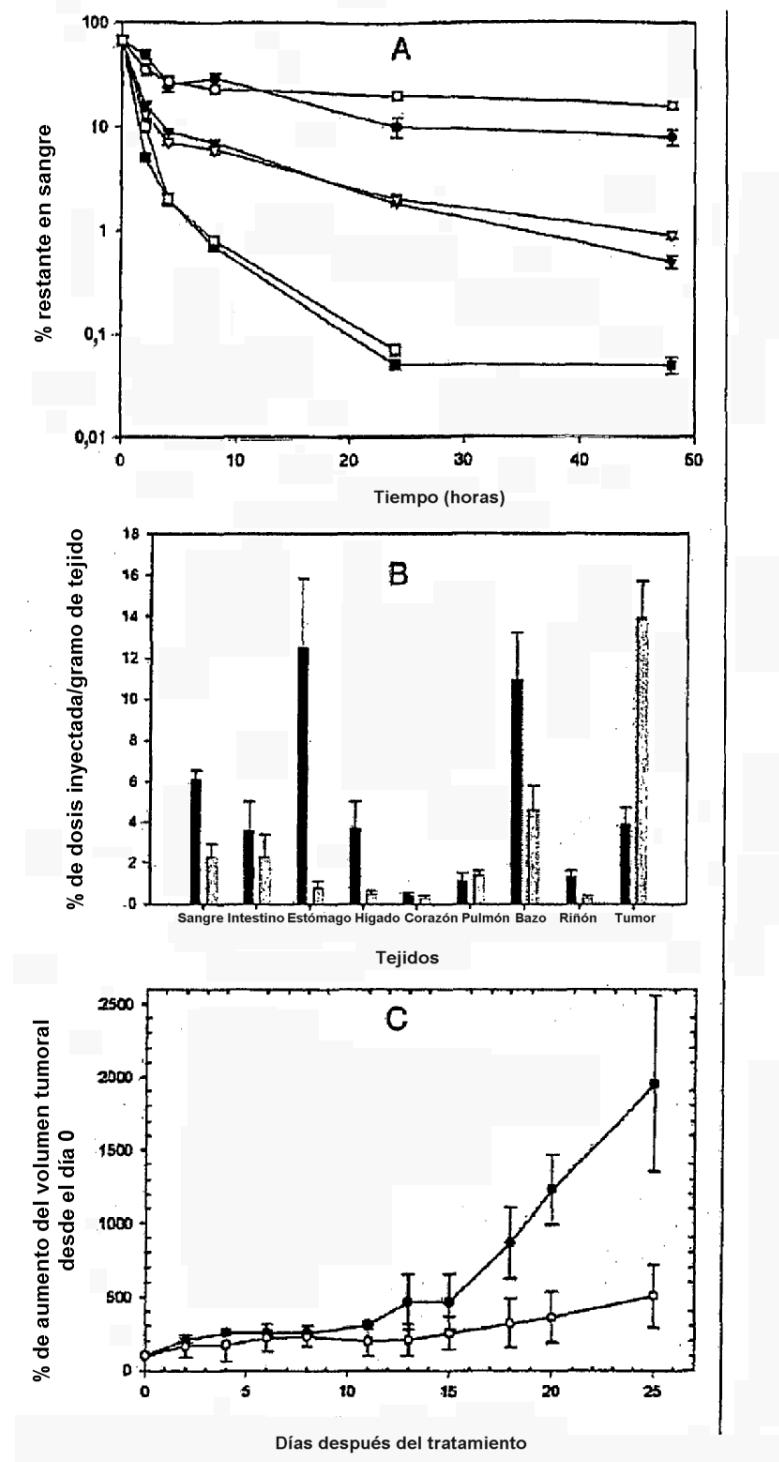


Figura 24

*Figura 25*

scFv	Dominio pesado variable		
GP6	EVQLVESGGGL-VQPQGSRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLVWWSRINSDGSSAS		
D1.3	QVQLQESGPGL-VAPSQSLSITCTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKGLEWLGMI-WGDGNTD		
HH10	DIVLTQSPATLSVTPGNSVSLSCRAS-QSIGNN-LHWYQQKSHESPRLLIKY-----ASQ		
MFE	QVKLQQSGAEL-VRSGTSVLSCTASGFNIKDSYMHWLRLQGPSEQGLEWIGWIDPENGTE		
F1	EVQLVQSGGGV-VQPGRSLRLSCAASGFTFDDYGMWSVRQAPGKGLEWWSGINWNGGSTG		
BC-1	EVQLVQSGADV-KKPGASVKVSKCASGYFTFTNYVMEMWVRQAPGQGLEWLGYINPYNDGTQ		
C6.5	QVQLLQSGAEV-KKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGMLIYPGDSDTK		
scFv	Dominio pesado variable		
GP6	YADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-TVT-----ER		
D1.3	YNSALKSRLSISKDNKSQVFLKMNSLHTDDTARYYCAREDRYR-----LDY		
HH10	SISGIPSRSFGSG--SGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQ-SNSWP-----YT		
MFE	YAPKFQGKATFTTDSSNTAYLQLSSLTSEDATAVYYCNEGTPTG-----PYYFDY		
F1	YADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTALYYCAR-AIRSYSGS-----YGNAFDI		
BC-1	YNERFKGRVTMTGDTsistaymelsrltsdttavyyCAR-EVYG-----NYIWGN		
C6.5	YSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVIDFCAR-HDVGYCSSSNCAKWPPEYFOH		
scFv	pesado variable	Enlazador	Dominio ligero variable
GP6	WGQGTLTVT	GGGGSGGGGGSGGSAL	SSELTQD-P-AVSVALGQTVRITCQGDSDL--RSY
D1.3	WGQGTTVTV	GGGGSGGGGGSGGSAL	DIQMTQS-PASLSASVGETVTITCRASGN--IHN
HH10	FGGGTKLEIK	GGG-SGGGGSGGGGS	DVQLQESGP-SLVK-PSQTLSLTCVTDGDSITSN-
MFE	WGQGTTVTV	GGGGSGGGGGSGGGGS	ENVLTQS-PAIMSASPGEKVITCSCASSS-VS--
F1	WGKGTIVTV	GGGGSGGGGGSGGGGS	DIQMTQS-PSTLSASIGDRVITCRASEG--IYH
BC-1	WGQGTLVSV	GGGGSGGGGGSGGSAL	EIVLTQS-PGTLSLSPGERATLSCSASSS-ISSN
C6.5	WGQGTLVTV	GGGGSGGGGGSGGGGS	QSVLTQD-P-SVSAAPGQKVTCSCGSSNIGNNN
scFv	Dominio ligero variable		
GP6	YASWYQQKPGQAPVVLVIYG----KNNRPMSGIPDRFSGS--SSGNTASLTITGAQAEDDEAD		
D1.3	YLAWYQQKQGKSPQLLVYY----TTTLADGVPSRFSGS--GSGTQYSLKINSLQPEDFGS		
HH10	YWSWIRKFPGNRLEYMGYVSYSGSTYYNPSLKSRIISITRDTSKNQYYLDLNSVTTEDTAT		
MFE	YMHWFOOKPGTSPKLWIYS---TSNLASGVPARFSGS--GSGTYSLTISRMEEADAAT		
F1	WLAWYQQKPGKAPKLLIYK---ASSLASGAPSRSFGS--GSGTDFTLTISSLQPDFFAT		
BC-1	YLHWYQQKPGQAPRLLIYR---TSNLASGVIPDRFSGS--GSGTDFTLTISRLEPEDFAV		
C6.5	YVSWYQQLPGTAPKLLIY---HTNRPAGVPDRFSGS-KSGTSASLAISGFRSEDEAD-		
scFv	Dominio ligero variable		
GP6	YYCNSRDS--SGTVFGGGTKLTVL		
D1.3	YYCQHFWS--TPRTFGGGTKLEIQ		
HH10	YYCANWDG--TFDYWGQGTIVTV		
MFE	YYCQRSS--YPLTFGAGTKLELK		
F1	YYCQQYSN--YPLTFGGGTIVLEIK		
BC-1	YYCQQGSS--IPFTFGQGTKLEIN		
C6.5	YYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVL		

Figura 26

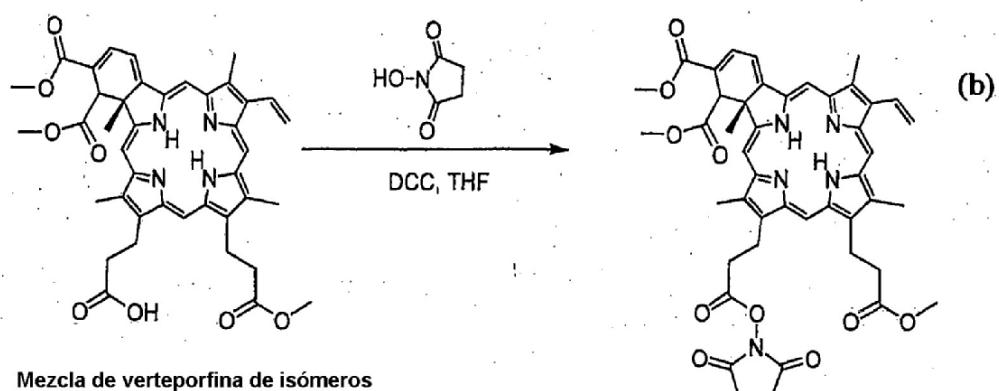


Figura 27

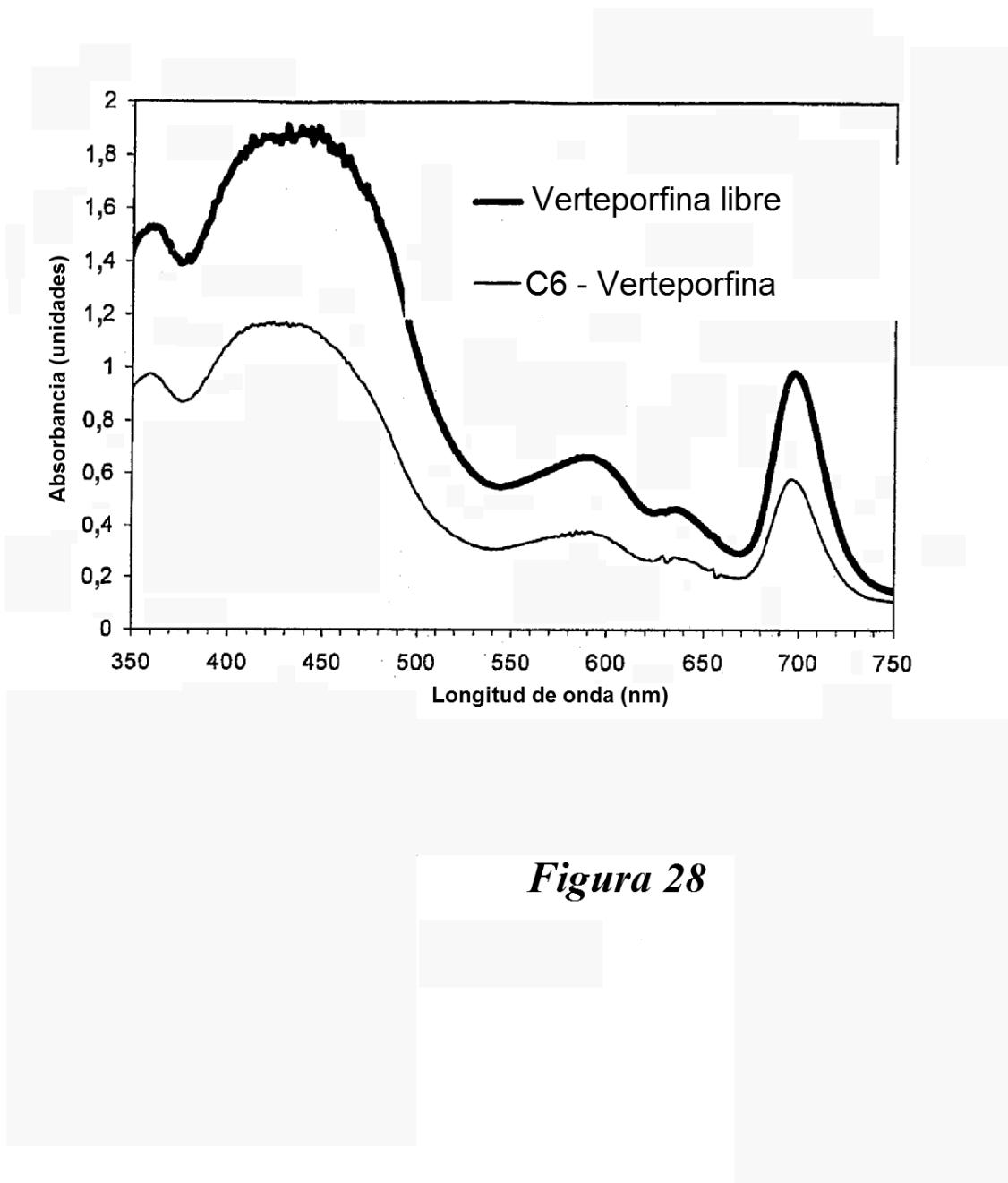
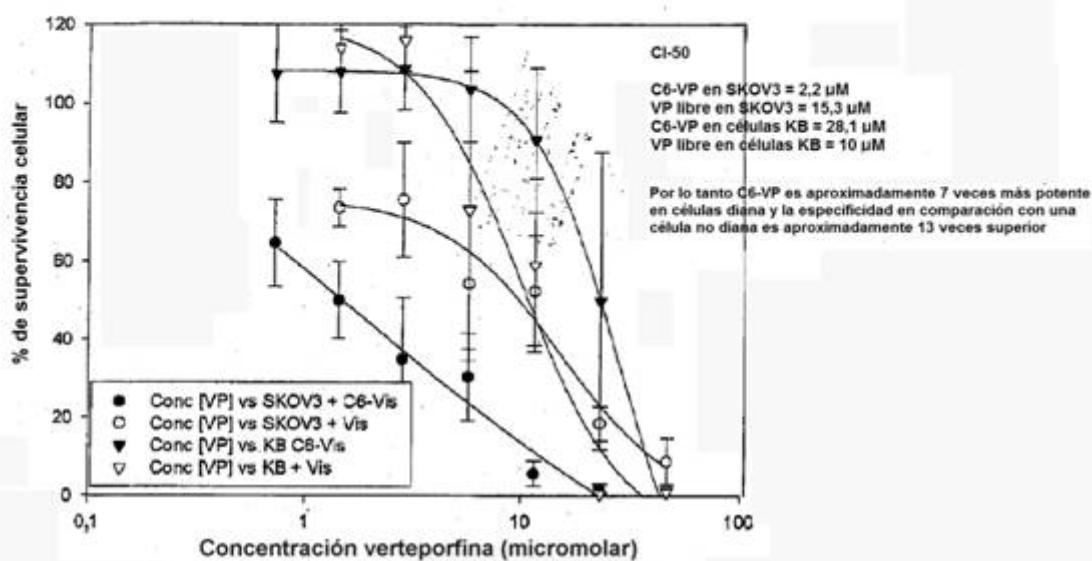


Figura 28

Destrucción celular de conjugados de scFv C6-Verteporfina (VP) en SKOV3 (+ve) y KB (células - ve)

*Figura 29*