

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 869**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2012 E 12735414 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2717917**

54 Título: **Conjugados de P97-anticuerpo**

30 Prioridad:

05.07.2011 US 201161504646 P

11.06.2012 US 201261658217 P

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

15.09.2016

73 Titular/es:

BIOASIS TECHNOLOGIES INC (100.0%)
10551 Shellbridge Way, Suite 125
Richmond, BC V6X 2W9, CA

72 Inventor/es:

HUTCHISON, ROB;
VITALIS, TIMOTHY Z y
GABATHULER, REINHARD

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 582 869 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 P97-anticuerpo.

5 ANTECEDENTES

Campo técnico

La presente divulgación se refiere generalmente a conjugados de p97-anticuerpo, composiciones relacionadas y métodos de uso de las mismas. Ciertas divulgaciones se refieren más específicamente a conjugados que comprenden una secuencia del polipéptido p97 y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor de la superficie celular o una proteína de la superficie celular, o un antígeno asociado a cáncer, tal como la proteína Her2/neu humana o el receptor Her1/EGF. Dichos conjugados de anticuerpos son útiles, por ejemplo, en método para tratar una diversidad de enfermedades, incluyendo enfermedades oncológicas, tales como cánceres que expresan Her2/neu y que expresan Her1/EGFR.

Descripción de la técnica relacionada

Superar las dificultades de administrar agentes terapéuticos a regiones específicas del cerebro representa un desafío importante para el tratamiento de la mayor parte de los trastornos cerebrales. En su papel neuroprotector, la barrera hematoencefálica (BHE) impide la administración de muchos agentes de diagnóstico y terapéuticos potencialmente importantes al cerebro. Las moléculas y genes terapéuticos que pueden ser eficaces de otro modo en el diagnóstico y la terapia no cruzan la BHE en las cantidades adecuadas. Se indica que más del 95 % de todas las moléculas terapéuticas no cruzan la barrera hematoencefálica.

Trastuzumab (nombre comercial Herceptin®), un anticuerpo monoclonal aprobado específico para la proteína Her2/neu humana, es una importante opción terapéutica en el tratamiento de aproximadamente el 30 % de los cánceres de mama humanos que son positivos para esta proteína. Aunque trastuzumab ha demostrado ser valioso en el tratamiento y control de una enfermedad sistémica; no puede abordar la propagación observada con frecuencia de las células cancerosas que expresan Her2/neu metastásicas en el sistema nervioso central (SNC), debido al hecho de que trastuzumab no puede cruzar la barrera hematoencefálica.

Existe una importante necesidad insatisfecha de mejorar el potencial terapéutico de los anticuerpos, incluyendo aquellos que son específicos para Her2/neu o Her1/EGFR. Por ejemplo, existe la necesidad de anticuerpos anti-Her2/neu o anti-Her1/EGFR y fragmentos de unión a antígeno que tengan una actividad mejorada y/o otras propiedades con respecto a los anticuerpos convencionales. Además, existe la necesidad de composiciones y métodos que faciliten la administración de los anticuerpos anti-Her2/neu o anti-Her1/EGFR a través de la barrera hematoencefálica para tratar eficazmente los cánceres de Her2/neu+ o Her1/EGFR+, particularmente aquellos que han metastatizado al SNC. Estas mismas necesidades se aplican a otros anticuerpos específicos para antígenos de cáncer, incluyendo anticuerpos que son específicos para Her3, antígeno A33, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23 (receptor de IgE), antígeno C242, 5T4, IL-6, IL-13, factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (por ejemplo, VEGF-A), y otros.

El documento WO 2004/078215 A2 desvela un conjugado que comprende una enzima unida covalentemente al anticuerpo herceptina. La presente invención aborda estas necesidades y ofrece otras ventajas relacionadas.

BREVE RESUMEN

La presente invención proporciona composiciones terapéuticas que comprenden una secuencia del polipéptido p97 y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno.

El antígeno o fragmento del mismo se une específicamente a la proteína Her2/neu humana o el receptor Her1/EGF humano.

En ciertos aspectos, la secuencia del polipéptido p97 y el anticuerpo o fragmento del mismo se unen cada uno a o se encapsulan en una partícula, por ejemplo, una nanopartícula, perla, formulación lipídica, partícula lipídica o liposoma, por ejemplo, un inmunoliposoma. En realizaciones particulares, la secuencia del polipéptido p97 está presente sobre la superficie de la partícula, y el anticuerpo o fragmento del mismo está presente sobre la superficie de la partícula y/o encapsulado dentro de la partícula.

En un aspecto general relacionado, la presente invención también proporciona conjugados terapéuticos que comprenden una secuencia del polipéptido p97 unida covalentemente a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno. El anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a la proteína Her2/neu humana. Como se describe en el presente documento, dichas composiciones y conjugados son de valor particular en el tratamiento de cánceres que expresan Her2/neu, incluyendo aquellos que han metastatizado al SNC.

La secuencia del polipéptido p97 usada en los conjugados de la invención puede ser básicamente cualquier secuencia aminoacídica obtenida a partir de una proteína p97. En una realización específica, la secuencia del polipéptido p97 usada en el conjugado de la invención comprende la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 1. En otra realización específica, la secuencia del polipéptido p97 es una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En otra realización específica más, la secuencia del polipéptido p97 es un fragmento de una secuencia de proteína p97 humana que tiene al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o más residuos aminoacídicos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1. En otra realización específica, la secuencia del polipéptido p97 es una secuencia del polipéptido p97 soluble. En otra realización específica más, la secuencia del polipéptido p97 es una secuencia que es eficaz para facilitar el transporte de un anticuerpo al que está unido a través de la barrera hematoencefálica.

Una secuencia del polipéptido p97 puede conjugarse con cualquier anticuerpo terapéutico o un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo anti-Her2/neu o un fragmento de unión a antígeno) usando cualquiera de una diversidad de metodologías conocidas y establecidas, cuyos ejemplos ilustrativos se describen en el presente documento. Estas técnicas incluyen técnicas de conjugación química. En otras realizaciones, las técnicas se basan en tecnología de ADN recombinante convencional (por ejemplo, para producir polipéptidos de fusión).

En ciertas realizaciones más específicas de la invención, la secuencia del polipéptido p97 está unida covalentemente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno con un enlazador. En una realización más específica, la secuencia del polipéptido p97 (a) está unida covalentemente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno con un reticulador polimérico, (b) está unida covalentemente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno a través de una nanopartícula, o (c) está unida operativamente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo a través de un liposoma. En otra realización específica, la secuencia del polipéptido p97 está unida covalentemente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno con un reticulador polimérico que comprende polietilenglicol. En otra realización específica, la secuencia del polipéptido p97 está unida covalentemente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno con un reticulador polimérico que comprende uno o más enlaces tioéter.

El anticuerpo anti-Her2/neu o un fragmento de unión a antígeno del mismo usado de acuerdo con la invención será capaz generalmente de unirse específicamente a una proteína Her2/neu humana que tiene una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

En una realización más específica, el anticuerpo anti-Her2/neu es trastuzumab o un fragmento de unión a antígeno, o derivado del mismo.

El conjugado de p97-anticuerpo también puede ser un polipéptido de fusión que comprende una secuencia del polipéptido p97 y un anticuerpo específico para Her2/neu o secuencia de unión a antígeno. Los polipéptidos de fusión pueden co-expresarse ventajosamente usando metodologías de ADN recombinante habituales para producir un conjugado deseado de la invención.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona polinucleótidos de fusión aislados, y células huésped que contienen los mismos, donde los polinucleótidos de fusión codifican polipéptidos de fusión que comprenden una secuencia del polipéptido p97 y un anticuerpo terapéutico o un fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, un anticuerpo específico de Her2/neu o un fragmento de unión a antígeno.

De acuerdo con otro aspecto más, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de p97-anticuerpo o un polinucleótido que codifica un conjugado de p97, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro aspecto más, la divulgación proporciona un método para el tratamiento de un sujeto con un cáncer que expresa Her2/neu administrando al sujeto una composición farmacéutica que comprende un conjugado de p97-anticuerpo de la invención. El cáncer que expresa Her2/neu que se va a tratar es, en ciertas divulgaciones,

un cáncer metastásico, particularmente un cáncer metastásico caracterizado por progresión al SNC.

También se incluyen conjugados, que comprenden una secuencia del polipéptido p97 unida covalentemente a un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la proteína Her2/neu humana.

En ciertas divulgaciones, el antígeno asociado a cáncer está asociado a uno o más de cáncer de mama, cáncer cerebral metastásico, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, carcinoma de células escamosas, carcinoma del SNC o cerebral, melanoma, cáncer no melanoma, cáncer tiroideo, cáncer endometrial, tumor epitelial, cáncer óseo, o un cáncer hematopoyético.

En algunas divulgaciones, el antígeno asociado a cáncer se selecciona entre uno o más de Her2/neu, receptor de Her1/EGF (EGFR), Her3, antígeno A33, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23 (receptor de IgE), antígeno C242, 5T4, IL-6, IL-13, factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (por ejemplo, VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, tenascina, vimentina, receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R), alfa-fetoproteína, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), integrina $\alpha_3\beta_3$, integrina $\alpha_5\beta_1$, receptor de folato 1, glucoproteína transmembrana NMB, proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP), glucoproteína 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (o CA-125), fosfatidilserina, antígeno de membrana prostático específico (PMSA), antígeno NR-LU-13, TRAIL-R1, miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 10b (TNFRSF10B o TRAIL-R2), miembro de la familia SLAM 7 (SLAMF7), antígeno EGP40 de pancarcinoma, factor de activación de linfocitos B (BAFF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, glucoproteína EpCAM (17-1A), muerte programada 1, proteína disulfuro isomerasa (PDI), fosfatasa de regeneración hepática 3 (PRL-3), fosfatasa ácida prostática, antígeno Lewis-Y, GD2 (un disialogangliósido expresado en tumores de origen neuroectodérmico), glipicano 3 (GPC3), y mesotelina.

En ciertas divulgaciones, el anticuerpo monoclonal se selecciona entre uno o más de trastuzumab, 3F8, abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, alacizumab (pegol), amatuximab, apolizumab, bavixumab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, bivatumab (mertansina), brentuximab vedotin, cantuzumab (mertansina), cantuzumab (ravtansina), capromab (pendetida), catumaxomab, cetuximab, citatumab (bogatox), cixutumumab, clivatuzumab (tetraxetan), conatumumab, dacetuzumab, dalotuzumab, detumomab, drozitumab, ecomeximab, edrecolomab, elotuzumab, enavatuzumab, ensituximab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, farletuzumab, FBTA05, figitumumab, flavotumab, galiximab, gemtuzumab, ganitumab, gemtuzumab (ozogamicina), girentuximab, glembatumumab (vedotin), ibritumomab tiuxetan, icrucumab, igovomab, indatuximab ravtansina, intetumumab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab (MDX-101), iratumumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab (mertansina), lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, matuzumab, milatumumab, mitumomab, mogamulizumab, moxetumomab (pasudotox), nacolomab (tafenatox), naptumomab (estafenatox), narnatumab, necitumumab, nimotuzumab, nivolumab, Neuradiab® (con o sin yodo radioactivo), NR-LU-10, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab (monatox), oregovomab, panitumumab, patritumab, pemtumomab, pertuzumab, primumab, racotumomab, radretumab, ramucirumab, rilatumumab, rituximab, robatumumab, samalizumab, sibrotuzumab, siltuximab, tabalumab, taplitumomab (paptox), tenatumomab, teprotumumab, TGN1412, ticilimumab, tremelimumab, tigatuzumab, TNX-650, tositumomab, TRBS07, tucotuzumab (celmoleukin), ublituximab, urelumab, veltuzumab, volociximab, votumumab y zalutumumab, incluyendo fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En divulgaciones específicas, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado o quimérico.

También se incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de p97-anticuerpo descrito en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Ciertas divulgaciones se refieren a métodos para el tratamiento de un sujeto con un cáncer, que comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un cáncer seleccionado entre uno o más de cáncer de mama, cáncer cerebral metastásico, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, carcinoma de células escamosas, carcinoma del SNC o cerebral, melanoma, cáncer no melanoma, cáncer tiroideo, cáncer endometrial, tumor epitelial, cáncer óseo, o un cáncer hematopoyético.

En divulgaciones particulares, el cáncer se asocia a la expresión de al menos uno de Her2/neu, Her1/EGFR, Her3, antígeno A33, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23 (receptor de IgE), antígeno C242, 5T4, IL-6, IL-13, factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (por ejemplo, VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, tenascina, 5 vimentina, receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R), alfa-fetoproteína, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), integrina $\alpha_v\beta_3$, integrina $\alpha_5\beta_1$, receptor de folato 1, glucoproteína transmembrana NMB, proteína de activación de fibroblastos, alfa (FAP), glucoproteína 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (o CA-125), fosfatidilserina, antígeno de membrana prostático específico (PMSA), antígeno NR-LU-13, TRAIL-R1, miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 10b 10 (TNFRSF10B o TRAIL-R2), miembro de la familia SLAM 7 (SLAMF7), antígeno EGP40 de pancarcinoma, factor de activación de linfocitos B (BAFF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, glucoproteína EpCAM (17-1A), muerte programada 1, proteína disulfuro isomerasa (PDI), fosfatasa de regeneración hepática 3 (PRL-3), fosfatasa ácida prostática, antígeno Lewis-Y, GD2 (un disialogangliósido expresado en tumores de origen neuroectodérmico), glipicano 3 (GPC3), o mesotelina. En ciertas divulgaciones, la porción de anticuerpo monoclonal 15 del conjugado de p97-anticuerpo se une específicamente al antígeno asociado a cáncer.

En ciertas divulgaciones, el cáncer es un cáncer colorrectal metastásico o un cáncer de cabeza y cuello, y el anticuerpo monoclonal se une específicamente a Her1/EGFR y es un antagonista de EGFR. En divulgaciones particulares, el anticuerpo monoclonal se une específicamente a (por ejemplo, uno o más epítomos continuos o 20 discontinuos de) la SEQ ID NO: 15 (Her1/EGFR). En ciertas divulgaciones, el cáncer es un cáncer colorrectal metastásico que expresa EGFR. En realizaciones específicas, el cáncer colorrectal es *KRAS* de tipo silvestre. En ciertas divulgaciones, el conjugado se administra después del fallo de ambos regímenes basados en irinotecán y oxiplatino. En algunas divulgaciones, el sujeto es intolerante a los regímenes basados en irinotecán o es resistente a la quimioterapia basada en irinotecán. En otros aspectos, el cáncer es un carcinoma de células escamosas local o 25 regionalmente avanzado de la cabeza y el cuello, un carcinoma de células escamosas de enfermedad locorregional recurrente o metastásico de la cabeza y el cuello, o un carcinoma de células escamosas recurrente o metastásico de la cabeza y el cuello que progresa después de una terapia basada en platino. En algunas divulgaciones, el conjugado se administra en combinación con terapia de radiación, terapia a base de platino, o terapia a base de platino con 5-FU. En algunas de estas divulgaciones y relacionadas, el anticuerpo es cetuximab, o un fragmento de 30 unión a antígeno del mismo.

Algunos conjugados comprenden un polipéptido p97 unido covalentemente a un anticuerpo (Ab) de acuerdo con una de las estructuras:

35 $p97(\text{FGly})\text{-R}_1\text{-Ab}$ o $p97\text{-R}_1\text{-(FGly)Ab}$

donde R_1 es al menos un enlace reactivo de aldehído; y FGly es un residuo de formilglicina en un motivo de sulfatasa heterólogo que comprende la estructura:

40 $X_1(\text{FGly})X_2Z_2X_3$ (SEQ ID NO: 5)

donde Z_2 es un residuo de prolina o alanina; X_1 está presente o ausente y, cuando está presente, es cualquier aminoácido, donde X_1 está presente opcionalmente cuando el motivo de sulfatasa heterólogo está en el extremo N del polipéptido p97; y cada uno de X_2 y X_3 es independientemente cualquier aminoácido.

45 En algunas realizaciones, R_1 comprende una base de Schiff. En realizaciones particulares, R_1 es un enlace oxima, un enlace hidrazina, o un enlace hidrazina carbotiamida.

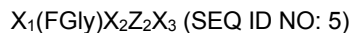
También se desvelan polipéptidos p97 aislados, que comprenden al menos un motivo de sulfatasa heterólogo que 50 comprende la siguiente estructura:

$X_1Z_1X_2Z_2X_3$ (SEQ ID NO: 6)

donde Z_1 es cisteína o serina; Z_2 es un residuo de prolina o alanina; X_1 está presente o ausente y, cuando está 55 presente, es cualquier aminoácido, donde X_1 está presente opcionalmente cuando el motivo de sulfatasa heterólogo está en el extremo N del polipéptido marcado con aldehído; y cada uno de X_2 y X_3 es independientemente cualquier aminoácido.

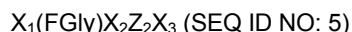
Ciertos polipéptidos p97 aislados comprenden al menos un motivo de sulfatasa heterólogo que comprende la

estructura:

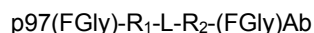


5 donde FGly es un residuo de formilglicina; Z_2 es un residuo de prolina o alanina; X_1 está presente o ausente y, cuando está presente, es cualquier aminoácido, donde X_1 está presente opcionalmente cuando el motivo de sulfatasa heterólogo está en el extremo N del polipéptido p97; y cada uno de X_2 y X_3 es independientemente cualquier aminoácido.

10 En algunas divulgaciones, el polipéptido p97 aislado se une covalentemente a un anticuerpo (Ab) que comprende al menos un motivo de sulfatasa heterólogo, donde el motivo comprende la estructura:



15 donde FGly es un residuo de formilglicina; Z_2 es un residuo de prolina o alanina; X_1 está presente o ausente y, cuando está presente, es cualquier aminoácido, donde X_1 está presente opcionalmente cuando el motivo de sulfatasa heterólogo está en el extremo N del anticuerpo; y cada uno de X_2 y X_3 es independientemente cualquier aminoácido, donde el polipéptido p97 y el anticuerpo se unen covalentemente a través de sus residuos FGly respectivos para formar un conjugado de p97-anticuerpo. En algunas realizaciones, el conjugado de p97-anticuerpo
20 aislado comprende la siguiente estructura:



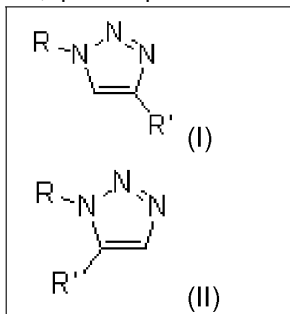
donde R_1 y R_2 son el mismo o diferente enlace reactivo de aldehído; y L es un resto enlazador.

25

En algunas realizaciones, el al menos un motivo de sulfatasa heterólogo está en el extremo C del polipéptido p97 y el extremo N del anticuerpo. En ciertas realizaciones, el al menos un motivo de sulfatasa heterólogo está en el extremo N del polipéptido p97 y el extremo C del anticuerpo. En realizaciones particulares, el al menos un motivo de sulfatasa heterólogo está en el extremo N del polipéptido p97 y el extremo N del anticuerpo. En algunas
30 realizaciones, el al menos un motivo de sulfatasa heterólogo está en el extremo C del polipéptido p97 y el extremo C del anticuerpo. En realizaciones específicas, R_1 y R_2 comprenden independientemente una base de Schiff. En ciertos casos, R_1 y R_2 son independientemente un enlace oxima, un enlace hidrazida, o un enlace hidrazina carbotiamida. En algunos casos, L es un péptido, un polímero soluble en agua, una etiqueta detectable, o un glicano.

35 También se incluyen métodos de producción de un polipéptido p97, que comprenden a) cultivar una célula huésped que expresa un polinucleótido introducido, donde el polinucleótido introducido codifica el polipéptido p97 de la reivindicación 20, y donde la célula huésped expresa una enzima de generación de formilglicina (FGE) que convierte Z_1 en un residuo de formilglicina (FGly); y b) aislar el polipéptido 97 de la célula. En algunas realizaciones, el polipéptido p97 comprende (i) al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral azida, o (ii) al menos un
40 aminoácido sintético con una cadena lateral alquino.

Ciertas realizaciones se refieren a un conjugado, que comprende la estructura (I) o (II):



45 donde R es un polipéptido p97 y R^1 es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; o donde R es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y R^1 es un polipéptido p97. El anticuerpo se une específicamente al Her2/neu humano.

En una realización específica, el anticuerpo es trastuzumab.

- También se incluyen métodos de producción de un conjugado de p97-anticuerpo, que comprende: (a) realizar una reacción de cicloadición azida-alquino entre: (i) un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral azida y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral alquino; o (ii) un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral alquino y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral azida; y (b) aislar un conjugado de p97-anticuerpo de la reacción, produciendo de esta manera un conjugado de p97-anticuerpo.
- 10 Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes en referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 15 Las figuras 1A-1D muestran los resultados de ensayos de viabilidad celular para la línea celular de cáncer de mama humana BT474.
Las figuras 2A-2D muestran los resultados de ensayos de viabilidad celular para la línea celular de cáncer de mama humana MCF7-HER2.
- 20 Las figuras 3A-3D muestran los resultados de ensayos de viabilidad celular para la línea celular de cáncer de mama humana MCF7-vector.
Las figuras 4A-4D muestran los resultados de ensayos de viabilidad celular para la línea celular de cáncer de mama humana SKBR3.
Las figuras 5A-5D muestran la biodistribución de proteínas marcadas con rodamina(rhod) en el tejido cerebral de ratones. En estas figuras, "MTF" es p97, "BTA" es trastuzumab, y "MTF-BTA" es un conjugado p97-trastuzumab.
- 25 Las figuras 6A-6F muestran la distribución de trastuzumab marcado con ^{125}I en el cerebro de ratón 24 horas después de una administración intravenosa. La figura 6A muestra metástasis cerebrales de tamaño heterogéneo en las regiones señaladas en rojo, y la figura 6B muestra la tinción con rojo Texas-dextrano de las metástasis. La figura 6C muestra un autoradiograma de trastuzumab marcado con ^{125}I , e indica el número de pliegues en el anticuerpo con respecto al tejido cerebral normal circundante. Como se muestra en la figura 6F, los valores de K_{in} para trastuzumab en solitario son aproximadamente $1,46 \times 10^{-7}$ ml/s/g en tejido cerebral normal y aproximadamente $3,8 \times 10^{-7}$ ml/s/g en metástasis cerebrales.
- 30 Las figuras 7A-7E muestran la distribución de trastuzumab marcado con ^{125}I en el cerebro de ratón y otros tejidos 24 horas después de una administración intravenosa. La figura 7A muestra metástasis cerebrales de tamaño heterogéneo en las regiones señaladas en rojo, y la figura 7B muestra la tinción con rojo Texas-dextrano de las metástasis. La figura 7C muestra en autoradiograma de trastuzumab marcado con ^{125}I , e indica el número de pliegues en el anticuerpo con respecto al tejido cerebral normal circundante. La figura 7D muestra la relación tejido-sangre de trastuzumab marcado con ^{125}I en diversos tejidos, y la figura 7E muestra la distribución en tejido cerebral normal y metástasis cerebrales (Met.).
- 35 Las figuras 8A-8F muestran la distribución de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I en el cerebro de ratón y otros tejidos dos horas después de una administración intravenosa. La figura 8A muestra metástasis cerebrales de tamaño heterogéneo en las regiones señaladas en rojo, y la figura 8B muestra la tinción con rojo Texas-dextrano de las metástasis. La figura 8C muestra un autoradiograma de conjugados de p97-trastuzumab marcados con ^{125}I , y la parte izquierda de la figura 8C indica la cantidad (ng/g) de conjugado que se observa en cada metástasis. La parte izquierda de la figura 8B muestra el aumento de pliegues de conjugado de p97-trastuzumab que se observa en cada metástasis, con respecto a la región cerebral alejada del tumor (BDT) mostrada en la figura 8A. La figura 8D muestra la relación tejido/sangre del conjugado de p97-trastuzumab para una diversidad de tejidos. La figura 8E muestra la relación del conjugado de p97-trastuzumab en cerebro normal/sangre y metástasis cerebrales/sangre. La figura 8F resume la concentración de conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I que se observa en las metástasis cerebrales individuales.
- 40 Las figuras 9A-9F muestran la distribución de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I en el cerebro de ratón y otros tejidos ocho horas después de una administración intravenosa. La figura 9A muestra metástasis cerebrales de tamaño heterogéneo en las regiones señaladas en rojo, y la figura 9B muestra la tinción con rojo Texas-dextrano de las metástasis. La figura 9C muestra un autoradiograma de conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I , y la parte izquierda de la figura 9C indica la cantidad (ng/g) de conjugado que se observa en cada metástasis. La parte izquierda de la figura 9B muestra el aumento de pliegues de conjugado de p97-trastuzumab que se observa en cada metástasis, con respecto a las regiones cerebrales alejadas del tumor (BDT) mostradas en la figura 9A. La figura 9D muestra la relación tejido/sangre del
- 45
- 50
- 55

conjugado de p97-trastuzumab para una diversidad de tejidos. La figura 9E muestra la relación del conjugado de p97-trastuzumab en cerebro normal/sangre y metástasis cerebrales/sangre. La figura 9F resume la concentración de conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I que se observa en las metástasis cerebrales individuales.

5 Las figuras 10A-10E resumen los datos de los puntos temporales de dos y ocho horas tras la administración intravenosa de conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I . La figura 10A muestra la relación tejido/sangre del conjugado de p97-trastuzumab para una diversidad de tejidos. La figura 10B muestra que los niveles de conjugado en tejido cerebral normal son ligeramente superiores en el punto temporal de 8 horas (con respecto al punto temporal de dos horas), y los niveles de conjugado en metástasis cerebrales son significativamente superiores en ese mismo punto temporal. La figura 10C muestra los valores de K_{in} medidos para el conjugado de p97-trastuzumab en tejido cerebral normal ($1,1 \times 10^{-4}$ ml/s/g) y metástasis cerebrales ($4,9 \times 10^{-4}$ ml/s/g). La figura 10D muestra el porcentaje de dosis inyectada en tejido cerebral en 2 y 8 horas, y la figura 10E resume la concentración de conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I en metástasis cerebrales individuales dos y ocho horas después de la administración.

10 Las figuras 11A y 11B muestran los análisis por HPLC de conjugados de p97-cetuximab. La figura 11A muestra el perfil de HPLC de la mezcla de reacción en bruto después de 24 horas a temperatura ambiente, y la figura 11B muestra el perfil de HPLC por exclusión de tamaño del conjugado 1:1 de p97-cetuximab purificado (>96 % de pureza, detección HPLC a 220 nm).

15 La figura 12 muestra un análisis SDS-PAGE del conjugado de p97-cetuximab purificado con respecto a la mezcla de reacción en bruto y p97 y cetuximab en solitario.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

25 SEQ ID NO: 1 es la secuencia aminoacídica de la proteína p97 melanotransferrina humana (NP_005920.2).
SEQ ID NO: 2 es la secuencia aminoacídica de la proteína Her2/neu humana (NP_004439.2).
SEQ ID NO: 3 es una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 1.
SEQ ID NO: 4 es una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 2.

30 SEQ ID NOS: 5 y 6 son motivos sulfatasa peptídicos.
SEQ ID NOS: 8-14 son enlazadores peptídicos.
SEQ ID NO: 15 es la secuencia aminoacídica del receptor de Her1/factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere generalmente a moléculas de conjugados que comprenden secuencias del polipéptido p97 unidas a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. También se incluyen composiciones que comprenden una secuencia del polipéptido p97 y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tales como composiciones a base de partículas, por ejemplo, liposomas.

Los anticuerpos o fragmentos se unen específicamente la proteína Her2/neu humana. Como se demuestra en el presente documento, trastuzumab (nombre comercial Herceptin[®]), un anticuerpo monoclonal humanizado usado clínicamente en el tratamiento de cáncer de mama HER2+, se unió químicamente a secuencias del polipéptido p97 para generar conjugados de p97-anticuerpo. De forma inesperada, los conjugados de p97-anticuerpo mostraron una mejora significativa en la actividad de destrucción del cáncer en comparación con trastuzumab en solitario. Además, los resultados confirmaron, como se esperaba, que trastuzumab no entra en las células endoteliales cerebrales humanas (HBE) en cultivo. Sin embargo, en el caso de conjugados de p97-anticuerpo, hubo un acentuado transporte de conjugados en las células HBE, lo que indicaba que los conjugados tienen el potencial de entrar en el tejido cerebral. La combinación de p97 y trastuzumab como un conjugado de proteínas también aumento sinérgicamente la administración a través de la barrera hematoencefálica al tejido del parénquima cerebral, con respecto a la administración de p97 en solitario y trastuzumab en solitario. Basándose en estos hallazgos inesperados, la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento mejorado de cánceres que expresan Her-2/neu, incluyendo los asociados a metástasis al SNC. La presente divulgación proporciona adicionalmente conjugados de p97-anticuerpo, composiciones y métodos relacionados para el tratamiento mejorado de otros tipos de cáncer, particularmente los que se asocian a, al menos, un antígeno que puede ser la diana de una terapia con anticuerpos.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos

convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la habilidad de la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con el fin de ilustración. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.(2009); Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Cloning, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª Edición, 2001); Maniatis y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) y otras referencias similares.

5 Pueden usarse técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis oligonucleotídica, y cultivo y transformación tisular (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación pueden realizarse de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realizan comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Estas y técnicas y procedimientos relacionados pueden realizarse generalmente de acuerdo con los métodos convencionales ya conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan a lo largo de toda la memoria descriptiva de patente. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, biología molecular, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica que se describen en el presente documento son aquellas ya conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para tecnología recombinante, biología molecular, microbiológica, síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica, y tratamiento de pacientes.

Las propiedades funcionales de los conjugados de p97-anticuerpo que se describen en el presente documento pueden evaluarse usando una diversidad de métodos conocidos por el experto, por ejemplo, ensayos de afinidad/unión (por ejemplo, resonancia de plasmones superficiales, ensayos de inhibición competitiva); ensayos de citotoxicidad, ensayos de viabilidad celular, ensayos de proliferación o diferenciación celular, inhibición del crecimiento de células cancerosas y/o tumoral usando modelo *in vitro* o *in vivo*. Otros ensayos pueden ensayar la capacidad de los conjugados descritos en el presente documento para bloquear las respuestas mediadas por Her2/neu normales. Los conjugados descritos en el presente documento también pueden ensayarse para comprobar los efectos sobre la internalización de receptores, la eficacia *in vitro* e *in vivo*, etc. Dichos ensayos pueden realizarse usando protocolos ya establecidos conocidos por el experto (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (Editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); o kits disponibles en el mercado.

SECUENCIAS DEL POLIPÉPTIDO P97

Como se ha indicado anteriormente, las moléculas y composiciones de conjugados ejemplares de la presente invención incluyen una secuencia del polipéptido p97. El término "polipéptido" se usa en su significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Un polipéptido puede ser una proteína entera, o una subsecuencia del mismo.

En ciertas realizaciones específicas, una secuencia del polipéptido p97 usada en un conjugado de la invención comprende la secuencia p97 humana expuesta en la SEQ ID NO: 1.

En otras realizaciones específicas, una secuencia del polipéptido p97 usada en un conjugado de la invención comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, a lo largo de su longitud, con una secuencia p97 humana expuesta en la SEQ ID NO: 1.

En otras realizaciones específicas más, una secuencia del polipéptido p97 usada en un conjugado de la invención comprende un fragmento de una secuencia p97 humana expuesta en la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, donde el fragmento comprende al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o más, aminoácidos contiguos, incluyendo todas las longitudes intermedias, de una secuencia p97 humana expuesta en la SEQ ID NO: 1.

En otras realizaciones específicas, una secuencia del polipéptido p97 usada en un conjugado de la invención comprende un fragmento de una secuencia p97 humana expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde el fragmento consiste en no más de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o más, aminoácidos contiguos, incluyendo

todas las longitudes intermedias, de una secuencia p97 humana expuesta en la SEQ ID NO: 1.

En otras realizaciones específicas más, una secuencia del polipéptido p97 usada en un conjugado de la invención comprende un fragmento de una secuencia p97 humana expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde el fragmento incluye 5 aproximadamente 20-500, 20-400, 20-300, 20-200, 20-100, o 20-50, aminoácidos contiguos de una secuencia p97 humana expuesta en la SEQ ID NO: 1.

Las secuencias del polipéptido p97 de interés son subsecuencias de aminoácidos y variantes de p97 que son eficaces para transportar un anticuerpo anti-Her2/neu a través de la barrera hematoencefálica.

10 Una secuencia del polipéptido p97 usada en un conjugado es una forma soluble de un polipéptido p97 (por ejemplo, Yang y col., Prot Exp Purif. 34: 28-48, 2004), o un fragmento o variante del mismo. En algunos aspectos, el polipéptido p97 tiene una delección de todo o una parte del dominio hidrófobo (residuos 710-738 de la SEQ ID NO: 1), en solitario o en combinación con una delección de todo o una parte del péptido señal (residuos 1-19 de la SEQ ID 15 NO: 1). En aspectos específicos, el polipéptido p97 comprende o consiste en los residuos 20-711 de la SEQ ID NO: 1, incluyendo variantes y fragmentos de los mismos.

En ciertas otras realizaciones, el fragmento o variante de p97 que se usa en un conjugado de la invención es un fragmento o variante capaz de unirse a un receptor p97, un receptor LRP1 y/o un receptor LRP1 B.

20 Se entenderá que un conjugado también puede comprender aminoácidos adicionales no relacionados con las secuencias de anticuerpos p97 y anti-Her2/neu presentes.

La secuencia del polipéptido p97 también puede ser una secuencia del polipéptido p97 variante. Una "variante" del 25 polipéptido p97, como se usa el término en el presente documento, es un polipéptidos que difiere típicamente de un polipéptido p97 desvelado específicamente en el presente documento en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores de la invención y evaluando su actividad como se describe en el presente documento y/o usando cualquiera de un número de técnicas ya conocidas en la 30 técnica.

En muchos casos, una variante contendrá sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es una en la que un aminoácido está sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de tal forma que un experto en la técnica de la química peptídica esperará que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del 35 polipéptido estén sustancialmente inalteradas. Como se ha descrito anteriormente, pueden hacerse modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y todavía puede obtenerse una molécula que codifica un polipéptido de variante o derivado con características deseables. Cuando se desea alterar la secuencia aminoacídica de un polipéptido para crear una equivalente, o incluso mejorada, variante o porción de un polipéptido de la invención, un experto en la técnica cambiará típicamente uno o más de los codones de la 40 secuencia de ADN codificante de acuerdo con la Tabla 1.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructurales tales como, por ejemplo, regiones de unión a 45 antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Dado que es la capacidad y naturaleza interactiva de una proteína la que define la actividad funcional biológica de esa proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones de secuencias de aminoácidos en una secuencia de proteínas y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente y, no obstante, obtener una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se contempla que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones desveladas, o las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin una apreciable pérdida de su utilidad.

50

Tabla 1

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU

Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

Al hacer dichos cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice aminoacídico hidropático al conferir una función biológica interactiva sobre una proteína se entiende generalmente en la técnica (Kyte & Doolittle, 1982, incorporado en el presente documento por referencia). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez, define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. Cada aminoácido tiene asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga (Kyte & Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se conoce en la técnica que ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similar y aún dar como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, aún obtener una proteína biológicamente funcionalmente equivalente. Al hacer dichos cambios, se prefiere la sustitución de los aminoácidos cuyos índices hidropáticos están en ± 2 , se prefieren particularmente aquellos en ± 1 , y son incluso más particularmente preferidos aquellos en $\pm 0,5$. También se entenderá en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse eficazmente sobre la base de la hidrofobicidad. La Patente de Estados Unidos 4.554.101 (incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad), indica que la mayor hidrofobicidad media local de una proteína, que se rige por la hidrofobicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la Patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofobicidad a residuos aminoacídicos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entenderá que un aminoácido puede estar sustituido por otro que tenga un valor de hidrofobicidad similar y aún obtener una proteína biológicamente equivalente biológicamente, y en particular, inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofobicidad están en ± 2 , se prefieren particularmente aquellos en ± 1 , y son incluso más particularmente preferidos aquellos en $\pm 0,5$.

Como se ha descrito anteriormente, por lo tanto, la sustituciones aminoacídicas se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral aminoacídica, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofobicidad, carga, tamaño, y similares. Se conocen bien por los expertos en la técnica sustituyentes ejemplares que pueden tener en consideración varias de las características anteriores e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Las sustituciones aminoacídicas pueden hacerse adicionalmente sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofobicidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos terminales polares que tienen valores de hidrofobicidad similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante también, o como alternativa, puede contener cambios no conservativos. En una realización

preferida, los polipéptidos de variante difieren de una secuencia nativa por la sustitución, delección o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes también (o como alternativa) pueden estar modificadas, por ejemplo, por la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima sobre la inmunogenicidad, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.

5

Como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo N terminal de la proteína, que dirige co-traduccionally o post-traduccionally la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede estar conjugado con un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, la purificación o la identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse con una región Fc de inmunoglobulina.

10

Los polipéptidos de la invención pueden prepararse usando cualquiera de una diversidad de técnicas sintéticas y/o recombinantes ya conocidas, las últimas de las cuales se describen adicionalmente a continuación. Los polipéptidos, porciones y otras variantes generalmente de menos de aproximadamente 150 aminoácidos pueden generarse por medios sintéticos, usando técnicas ya conocidas por los expertos en la técnica. En un ejemplo ilustrativo, dichos polipéptidos se analizan usando cualquiera de las técnicas en fase sólida disponibles en el mercado, tal como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, donde los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena aminoacídica creciente. Véase, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-46 (1963). El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos está disponible en el mercado en proveedores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), y puede manejarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15

20

En general, las composiciones polipeptídicas (incluyendo los polipéptidos de fusión) de la invención están aislados. Un polipéptido "aislado" es uno que se retira de su entorno original. Por ejemplo, una proteína o polipéptido de origen natural está aislado si se separa de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente, dichos polipéptidos también están purificados, por ejemplo, son al menos aproximadamente un 90 % puros, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % puros, y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente un 99 % puros.

25

Al comparar las secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos en las dos secuencias es la misma al alinearse para una correspondencia máxima, como se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias típicamente se realizan comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en las que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen óptimamente.

30

35

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse usando el programa Megalign en el conjunto de software bioinformático Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O., *A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships* (1978). In *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, sup. 3, págs. 345-58 (Dayhoff, M.O., ed.); Hein J., *Methods in Enzymology* 183: 626-45 (1990); Higgins y col., *CABIOS* 5: 151-53 (1989); Myers y col., *CABIOS* 4: 11-17 (1988); Robinson, E.D., *Comb. Theor* 11: 105 (1971); Saitou y col., *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-25 (1987); Sneath y col., *Numerical Taxonomy- the Principles and Practice of Numerical Taxonomy* (1973); Wilbur y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 726-30 (1983).

40

45

Como alternativa, puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación por el algoritmo de identidad local de Smith y col., *Add. APL. Math* 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y col., *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por la búsqueda de procedimientos similares de Pearson y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), por implantaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección.

50

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col., *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402 (1977), y Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215: 403-10 (1990), respectivamente. Pueden usarse BLAST y BLAST 2.0, por ejemplo con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. El software para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. Para secuencias de

55

aminoácidos, puede usarse una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa cae en la cantidad X de su valor máximo adquirido; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento.

En un enfoque preferido, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la parte de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, habitualmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en el que el residuo de ácido nucleico o aminoacídico idéntico aparece en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando los resultados por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

ANTICUERPOS

Como se conoce bien en la técnica, un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de, al menos, un sitio de reconocimiento de epítipo, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término no sólo incluye anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), (ScFv) monocatenario, variantes sintéticas de los mismos, variantes de origen natural, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo con un fragmento de unión a antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio o fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítipo) de la especificidad requerida. Los "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica (documento WO94/13804; P. Holliger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993) también son una forma particular de anticuerpos contemplada en el presente documento. También se incluyen en el presente documento minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (S. Hu y col., Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996). Véase, por ejemplo, Ward, E. S. y col., Nature 341, 544-546 (1989); Bird y col., Science, 242, 423-426, 1988; Huston y col., PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); documento PCT/US92/09965; documento WO94/13804; P. Holliger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993; Y. Reiter y col., Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996; S. Hu y col., Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996.

La expresión "fragmento de unión a antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento polipeptídico que contiene al menos una CDR de cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina que se une al antígeno de interés, por ejemplo, la proteína Her2/neu humana. A este respecto, un fragmento de unión a antígeno de los anticuerpos que se describen en el presente documento puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 CDR de una secuencia VH y VL de anticuerpos que se unen a una diana terapéutica o de diagnóstico, tal como Her2/neu humano.

El término "antígeno" se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse por un agente de unión selectivo, tal como un anticuerpo, y que puede usarse adicionalmente en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante, preferiblemente un determinante polipeptídico, capaz de realizar una unión específica a un receptor de inmunoglobulina o linfocitos T. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítipo incluyen agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo, y pueden tener, en ciertas realizaciones, características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un cuando reconoce preferiblemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación en equilibrio es $\leq 10^{-7}$ o 10^{-8} M. En algunas realizaciones, la constante de disociación en equilibrio puede ser $\leq 10^{-9}$ M o $\leq 10^{-10}$ M.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describe en el presente documento, incluyen un conjunto de CDR de cadena pesada y un conjunto de CDR de cadena ligera, respectivamente interpuesto entre un conjunto de región marco (FR) de cadena pesada y un conjunto de región marco (FR) de cadena ligera que proporcionan soporte a las CDR y definen la relación espacial de las CDR una con respecto a otra. Como se usa en el presente documento, la expresión "conjunto de CDR" se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de cadena pesada o ligera. Partiendo del extremo N de una cadena pesada o ligera, estas regiones se representan como "CDR1", "CDR2" y "CDR3", respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprende el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena pesada y una región V de cadena ligera. Un polipéptido que comprende una única CDR, (por ejemplo, una CDR1, CDR2 o CDR3) se denomina en el presente documento como una "unidad de reconocimiento molecular". Los análisis cristalográficos de varios complejos antígeno-anticuerpo han demostrado que los residuos de aminoácidos de las CDR forman un contacto extenso con el antígeno unido, en el que el contacto más extenso con el antígeno es con CDR3 de cadena pesada. Por lo tanto, las unidades de reconocimiento molecular son responsables principalmente de la especificidad de un sitio de unión a antígeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "conjunto de FR" se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que enmarcan las CDR de un conjunto de CDR de una región V de cadena pesada o ligera. Algunos residuos de FR pueden contactar con el antígeno unido; sin embargo, las FR son principalmente responsables del plegamiento de la región V en el sitio de unión al antígeno, concretamente los residuos de FR directamente adyacentes a las CDR. En las FR, determinados residuos de aminoácidos y determinadas características estructurales están altamente conservados. A este respecto, todas las secuencias de región V contienen un bucle disulfuro interno de aproximadamente 90 residuos de aminoácidos. Cuando las regiones V se pliegan en un sitio de unión, las CDR se presentan como restos de bucle proyectados que forman una superficie de unión a antígeno. Generalmente se reconoce que existen regiones estructurales conservadas de las FR que influyen en la conformación plegada de los bucles de CDR en ciertas estructuras "canónicas" con independencia de la secuencia de aminoácidos de la CDR precisa. Además, se sabe que determinados residuos de FR participan en contactos interdominio no covalentes que estabilizan la interacción de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo.

Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a Kabat, E. A. y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4ª Edición. US Department of Health and Human Services. 1987, y actualizaciones del mismo, ahora disponible en Internet (immuno.bme.nwu.edu).

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea en la que el anticuerpo monoclonal consiste en aminoácidos (de origen natural o de origen sintético) que están implicados en la unión selectiva de un epítipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, que están dirigidos contra un único epítipo. La expresión "anticuerpo monoclonal" incluye no sólo anticuerpos monoclonal intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), (ScFv) monocatenario, variantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de unión a antígeno, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítipo) de la especificidad requerida y la capacidad de unirse a un epítipo. No pretende limitarse en cuanto a la fuente del anticuerpo o la manera en la que se hace (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). La expresión incluye inmunoglobulinas completas, así como los fragmentos, etc., que se han descrito anteriormente bajo la definición de "anticuerpo".

La enzima proteolítica papaína escinde preferiblemente moléculas de IgG para producir varios fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos F(ab)) comprenden cada uno un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión a antígeno intacto. La enzima pepsina es capaz de escindir moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, incluyendo el fragmento F(ab')₂ que comprende ambos sitios de unión al antígeno. Un fragmento Fv para su uso de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, puede producirse por escisión proteolítica preferencial de una IgM, y en raras ocasiones de una molécula de inmunoglobulina IgG o IgA. Los fragmentos Fv, sin embargo, se obtienen más comúnmente usando mecanismos recombinantes conocidos en la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero VH::VL no covalente incluyendo un sitio de unión a antígeno que retiene la mayor parte de las capacidades de reconocimiento y unión a antígeno de la molécula de anticuerpo nativa. Inbar y col. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 2659-2662; Hochman y col. (1976) *Biochem* 15: 2706-2710; y Ehrlich y col. (1980) *Biochem* 19: 4091-4096.

En ciertas realizaciones, se contemplan anticuerpos Fv o scFV monocatenarios. Por ejemplo, pueden prepararse cuerpos Kappa (Ill y col., *Prot. Eng.* 10: 949-57 (1997); minicuerpos (Martin y col., *EMBO J* 13: 5305-9 (1994);

diacuerpos (Holliger y col., PNAS 90: 6444-8 (1993); o Janusins (Traunecker y col., EMBO J 10: 3655-59 (1991) y Traunecker y col., Int. J. Cancer Suppl. 7: 51-52 (1992), usando técnicas de biología molecular convencionales siguiendo las técnicas de la presente solicitud con respecto a la selección de anticuerpos que tengan la especificidad deseada.

5

Un polipéptido de cadena sencilla Fv (sFv) es un heterodímero $V_H::V_L$ unido covalentemente que se expresa a partir de una fusión génica incluyendo genes que codifican V_H y V_L unidos por un conector que codifica un péptido. Huston y col. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(16): 5879-5883. Se han descrito varios métodos para discernir estructuras químicas para convertir las cadenas de polipéptido de cadena ligera y pesada agregadas naturalmente pero

10

químicamente separadas de una región V de anticuerpo en una molécula sFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.091.513 y 5.132.405, de Huston y col.; y la Pat. de Estados Unidos N° 4.946.778, de Ladner y col.

15

En ciertas realizaciones, un anticuerpo, como se describe en el presente documento, está en forma de un diacuerpo. Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio de cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando los dos dominios unidos (por ejemplo, mediante un enlazador peptídico) pero incapaces de asociarse entre sí para formar un sitio de unión a antígeno: los sitios de

20

unión a antígeno se forman por la asociación del primer dominio de un polipéptido en el multímero con el segundo dominio de otro polipéptido en el multímero (documento WO94/13804). Un fragmento dAb de un anticuerpo consiste en un dominio VH (Ward, E. S. y col., Nature 341, 544-546 (1989)).

25

Cuando se usan anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse en una diversidad de maneras (Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecífico que se han mencionado anteriormente. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin una región Fc, usando únicamente dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de la reacción anti-idiotípica.

30

Los diacuerpos biespecíficos, al contrario que los anticuerpos enteros biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles ya que pueden construirse fácilmente y expresarse en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas, pueden seleccionarse fácilmente usando expresión de fagos (documento WO94/13804) de bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo se va a

35

mantener constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces puede hacerse una biblioteca en la que el otro brazo se varíe y un anticuerpo de la especificidad apropiada se seleccione. Los anticuerpos enteros biespecíficos pueden hacerse por la tecnología botón en ojal (J. B. B. Ridgeway y col., Protein Eng., 9, 616-621, 1996).

40

En ciertas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden proporcionarse en forma de un UniBody®. Un UniBody® es un anticuerpo IgG4 con la región bisagra eliminada (véase, GenMab Utrecht, Países Bajos; véase también, por ejemplo, el documento US20090226421). Esta tecnología de anticuerpos crea un formato de anticuerpo estable más pequeño con una ventana terapéutica mayor anticipada que los formatos de anticuerpo pequeños actuales. Los anticuerpos IgG4 se consideran inertes y, por lo tanto, no interactúan con el sistema

45

inmunitario. Los anticuerpos IgG4 completamente humanos pueden modificarse eliminando la región bisagra del anticuerpo para obtener fragmentos de semi-molécula que tengan propiedades de estabilidad distintas con respecto al IgG4 intacto correspondiente (GenMab, Utrecht). La reducción a la mitad de la molécula IgG4 deja únicamente un área en el UniBody® que puede unirse a antígenos afines (por ejemplo, dianas de enfermedad) y, por lo tanto, el UniBody® se une univalentemente a sólo un sitio en las células diana. Para ciertos antígenos de la superficie de

50

células de cáncer, esta unión univalente puede no estimular el crecimiento de las células cancerosas como puede observarse usando anticuerpos bivalentes que tienen la misma especificidad a antígeno y, por lo tanto, la tecnología UniBody® puede proporcionar opciones de tratamiento para algunos tipos de cáncer que pueden ser refractarios al tratamiento con anticuerpos convencionales. El pequeño tamaño del UniBody® puede ser un gran beneficio al tratar algunas formas de cáncer, permitiendo una mejora distribución de la molécula por tumores sólidos más grandes y

55

aumentando potencialmente la eficacia.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden adoptar la forma de un nanocuerpo. Los nanocuerpos se codifican por genes individuales y se producen de manera eficiente en casi todos los huéspedes procariontes y eucariotes, por ejemplo, *E. coli* (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N° 6.765.087), mohos

(por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyvermyces*, *Hansenula* o *Pichia* (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N° 6.838.254). El proceso de producción es escalable y se han producido cantidades en multi-kilogramos de nanocuerpo. Los nanocuerpos pueden formularse en forma de una solución lista para usar que tenga una larga vida útil. El método Nanoclone (véase, por ejemplo, el documento WO 06/079372) es un método patentado para generar nanocuerpos contra una diana deseada, basándose en una selección de alto rendimiento automatizada de linfocitos B.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos están humanizados. Esto se refiere a una molécula quimérica, generalmente preparada usando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión a antígeno obtenido a partir de una inmunoglobulina de una especie no humana y la estructura de la inmunoglobulina restante de la molécula basada en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender dominios variables completos condensados en dominios constantes o únicamente las CDR injertadas en regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión e epítipo pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones aminoacídicas. Esto elimina la región constante como un inmunógeno en individuos humanos, pero sigue existiendo la posibilidad de una respuesta inmune a la región variable extraña (LoBuglio, A. F. y col., (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86: 4220-4224; Queen y col., PNAS (1988) 86: 10029-10033; Riechmann y col., Nature (1988) 332: 323-327). Los métodos ilustrativos de humanización de anticuerpos incluyen los métodos descritos en la patente de Estados Unidos N° 7.462.697.

Otro enfoque se centra no sólo en proporcionar regiones constantes de origen humano, sino en modificar las regiones variables también a fin de cambiarlas de forma lo más posible a su forma humana. Se sabe que las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como ligeras contienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los epítopos en cuestión y determinar la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco (FR) que están relativamente conservadas en una especie determinada y que supuestamente proporcionan un andamiaje para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un epítipo específico, las regiones variables pueden "cambiarse de forma" o "humanizarse" injertando las CDR procedentes de anticuerpos no humanos en las FR presentes en el anticuerpo humano que se va a modificar. La aplicación de este enfoque a diversos anticuerpos se ha indicado por Sato, K., y col., (1993) Cancer Res 53: 851-856. Riechmann, L., y col., (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyen, M., y col., (1988) Science 239: 1534-1536; Kettleborough, C. A., y col., (1991) Protein Engineering 4: 773-3783; Maeda, H., y col., (1991) Human Antibodies Hybridoma 2: 124-134; Gorman, S. D., y col., (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88: 4181-4185; Tempest, P. R., y col., (1991) Bio/Technology 9: 266-271; Co, M. S., y col., (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88: 2869-2873; Carter, P., y col., (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89: 4285-4289; y Co, M. S. y col., (1992) J Immunol 148: 1149-1154. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis), que se alteran con respecto al anticuerpo original, que se denominan también una o más CDR "procedentes de" una o más CDR del anticuerpo original.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos quiméricos. A este respecto, un anticuerpo quimérico está compuesto por un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo unido operativamente, o condensado de otro modo, a una porción Fc heteróloga de un anticuerpo diferente. En ciertas realizaciones, el dominio Fc heterólogo es de origen humano. En otras realizaciones, el dominio Fc heterólogo puede ser de una clase de Ig diferente del anticuerpo precursor, incluyendo IgA (incluyendo las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (incluyendo las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), e IgM. En realizaciones adicionales, el dominio Fc heterólogo puede consistir en los dominios CH2 y CH3 de una o más de las diferentes clases de Ig. Como se ha indicado anteriormente con respecto a los anticuerpos humanizados, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo quimérico puede comprender únicamente uno o más de los CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento), o puede comprender todo un dominio variable (VL, V, o ambos).

Un epítipo que "se une específicamente" o "se une preferiblemente" (usados de forma intercambiable en el presente documento) a un anticuerpo o un polipéptido es un término bien entendido en la técnica, y también se conocen bien en la técnica métodos para determinar dicha unión específica o preferida.

Se dice que una molécula muestra "unión específica" o "unión preferida" si reacciona o se asocia con más frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con una mayor afinidad con una determinada célula o sustancia de lo que lo hace con otras células o sustancias. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferiblemente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con una mayor duración que a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferiblemente a un epítipo específico es un

anticuerpo que se une este epítipo específico con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que a otros epítopos. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específica o preferiblemente a una primera diana puede o no unirse específica o preferiblemente a una segunda diana. Como tal, la "unión específica" o "unión preferida" no requiere necesariamente 5 (aunque puede incluir) unión exclusiva. Por lo general, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión preferida.

La unión inmunológica se refiere generalmente a las interacciones no covalentes del tipo que ocurren entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica, por ejemplo, a modo de 10 ilustración y no de limitación, como resultado de atracciones o repulsión electrostática, iónica, hidrófila y/o hidrófoba, fuerzas estéricas, enlace de hidrógeno, fuerzas van der Waals, y otras interacciones. La fuerza, o afinidad de las interacciones de unión inmunológica pueden expresarse en cuando a la constante de disociación (K_d) de la interacción, donde una K_d menor representa una mayor afinidad. Las propiedades de la unión inmunológica de polipéptidos seleccionados pueden cuantificarse usando métodos ya conocidos en la técnica. Uno de dichos 15 métodos conlleva medir las velocidades de la formación del complejo de sitio unión a antígeno/antígeno y disociación, donde estas velocidades dependen de las concentraciones de las parejas del complejo, la afinidad de la interacción, y de parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Así, tanto la "constante de asociación" (K_{on}) como la "constante de disociación" (K_{off}) pueden determinarse por el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. La relación de K_{off}/K_{on} permite la cancelación 20 de todos los parámetros no relacionados con la afinidad y, por lo tanto, es igual a la constante de disociación K_d . Véase, en general, Davies y col. (1990) Annual Rev. Biochem. 59: 439-473.

El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la proteína Her2/neu humana. Básicamente puede usarse cualquier anticuerpo anti-Her2/neu, fragmento de unión a antígeno u otro 25 agente de unión específico para Her2/neu en la producción de los conjugados de p97-anticuerpo de la presente invención. Se describen anticuerpos anti-Her2/neu ilustrativos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.677.171; 5.720.937; 5.720.954; 5.725.856; 5.770.195; 5.772.997; 6.165.464; 6.387.371; y 6.399.063.

En realizaciones específicas, el anticuerpo anti-Her2/neu usado en un conjugado de la invención es trastuzumab 30 (Herceptin[®]), o un fragmento o derivado del mismo. Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal específico para Her2/neu aprobado para el tratamiento de cáncer de mama humano. Como se demuestra en el presente documento, la conjugación de secuencias aminoacídicas de p97 con el anticuerpo trastuzumab dio como resultado inesperadamente mayores niveles de destrucción de células cancerosas que con el anticuerpo trastuzumab en solitario. Además, hubo un transporte significativo de los conjugados de p97-anticuerpo a las células HBE, lo que 35 sugiere que los conjugados serán eficaces para su administración a través de la barrera hematoencefálica. Datos adicionales sugieren fuertemente que pueden conseguirse concentraciones terapéuticamente eficaces del conjugado de p97-trastuzumab en metástasis de tejido cerebral, incluso por la administración sistémica (por ejemplo, intravenosa) de dichos conjugados. Estos datos también sugieren que p97 y trastuzumab actúan sinérgicamente juntos para dirigir selectivamente los conjugados de p97-trastuzumab a metástasis cerebrales con respecto al tejido 40 cerebral normal, y a una velocidad significativamente superior (~1000 veces) que trastuzumab en solitario. Por lo tanto, la conjugación con p97 no sólo aumenta el transporte de trastuzumab a través de la barrera hematoencefálica, sino que también a través de la barrera sangre-tumor. Adicionalmente, debido a la distribución reducida a tejidos del corazón con respecto a otros tejidos, estos datos sugieren que la conjugación con p97 puede reducir los efectos cardiotóxicos de los anticuerpos, tal como trastuzumab. Por consiguiente, los conjugados de p97-anticuerpo de la 45 invención, en ciertas realizaciones, darán lugar a ventajas particulares en el tratamiento de cánceres que expresan Her2/neu, incluyendo, pero sin limitación, aquellos que han metastatizado al SNC.

En algunas realizaciones, un fragmento de unión a anti-Her2/neu comprende una o más de las CDR de un anticuerpo Her2/neu. A este respecto, se ha mostrado en algunos casos que la transferencia sólo de la VHCDR3 de 50 un anticuerpo puede realizarse mientras que aún se mantiene la unión específica deseada (Barbas y col., PNAS (1995) 92: 2529-2533). Véase también, McLane y col., PNAS (1995) 92: 5214-5218, Barbas y col., J. Am. Chem. Soc. (1994) 116: 2161-2162.

Los anticuerpos pueden prepararse mediante cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas por los expertos 55 en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Los anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido de interés pueden prepararse, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976, y mejoras para la misma. También se incluyen métodos que utilizan animales transgénicos, tales como ratones, para expresar anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature Biotechnology 14: 826, 1996; Lonberg y col., Handbook of

Experimental Pharmacology 113: 49-101, 1994; y Lonberg y col., Internal Review of Immunology 13: 65-93, 1995. Los ejemplos particulares incluyen la plataforma VELOCIMMUNE® de REGENEREX® (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.596.541).

- 5 Los anticuerpos también pueden generarse o identificarse mediante el uso de bibliotecas de expresión en fago o bibliotecas de expresión en levadura (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 7.244.592; Chao y col., Nature Protocols. 1: 755-768, 2006). Los ejemplos no limitantes de bibliotecas disponibles incluyen bibliotecas clonadas o sintéticas, tales como la Biblioteca de anticuerpos recombinantes humanos (HuCAL), en las que la diversidad estructural del repertorio de anticuerpos humanos se representa por siete genes de región variable de
- 10 cadena pesada y siete de cadena ligera. La combinación de estos genes da lugar a 49 marcos en la biblioteca maestra. Superponiendo los casetes genéticos altamente variables (CDR = regiones determinantes de complementariedad) en estos marcos, puede reproducirse la gran mayoría del repertorio de anticuerpos humanos. También se incluyen bibliotecas humanas diseñadas con fragmentos procedentes de donantes humanos que codifican una región variable de cadena ligera, una CDR-3 de cadena pesada, una diversidad que codifica ADN
- 15 sintético en la CDR-1 de cadena pesada, y una diversidad que codifica ADN sintético en la CDR-2 de cadena pesada. Serán evidentes para los expertos en la técnica otras bibliotecas adecuadas para su uso. Los polipéptidos p97 descritos en el presente documento y conocidos en la técnica pueden usarse en el proceso de purificación, por ejemplo, en una etapa de cromatografía de afinidad.
- 20 Estas técnicas recién descritas se conocen, en sí mismas, tal cual en la técnica. Sin embargo, el experto podría usar dichas técnicas para obtener anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y para acoplarlos covalentemente con secuencias del polipéptido p97 de acuerdo con varias realizaciones de la invención descritas en el presente documento.

25 CONJUGADOS DE P97-ANTICUERPO

La conjugación de una secuencia del polipéptido p97 y un anticuerpo o fragmento de unión del mismo puede realizarse usando técnicas químicas, bioquímicas y/o moleculares convencionales. De hecho, será evidente cómo preparar un conjugado de p97-anticuerpo a la luz de la presente divulgación usando metodologías reconocidas en la

30 técnica disponibles. Por supuesto, se preferirá generalmente, al unir los componentes principales de un conjugado de la presente invención, que las técnicas de conjugación empleadas y las químicas de unión resultantes no interrumpen sustancialmente la funcionalidad o actividad deseada de los componentes individual del conjugado.

En ciertas realizaciones, los conjugados de la invención pueden emplear cualquier grupo de unión adecuado o tipos conocidos en la técnica para unir una secuencia polipeptídica heteróloga a un anticuerpo o secuencia de unión a

35 antígeno. Preferiblemente, la capacidad de unión a antígeno (por ejemplo, proteína Her-2/neu humana, Her1/EGFR humano) y/o la actividad del conjugado no se reducen sustancialmente como resultado de la técnica de conjugación empleada, por ejemplo, en comparación con el anticuerpo no conjugado, tal como el anticuerpo anti-Her2/neu no conjugado.

40 En ciertas realizaciones, una secuencia del polipéptido p97 puede acoplarse (por ejemplo, unida covalentemente) a un anticuerpo o fragmento de unión del mismo adecuado (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-Her2/neu) directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un grupo enlazador). Es posible una reacción directa entre una secuencia del polipéptido p97 y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por

45 ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Como alternativa, puede ser deseable acoplar una secuencia del polipéptido p97 y un anticuerpo o fragmento de

50 unión del mismo (por ejemplo, anticuerpo anti-Her2/neu o fragmento de unión del mismo) a través de un grupo enlazador. Un grupo enlazador también puede funcionar como un espaciador para distanciar un anticuerpo de la secuencia del polipéptido p97 con el fin de evitar interferencia con las capacidades de unión, las capacidades de direccionamiento u otras capacidades. Un grupo enlazador también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un agente o un anticuerpo y, por lo tanto, aumentar la eficiencia de acoplamiento. Un

55 aumento de la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes, o grupos funcionales sobre agentes, lo que de otro modo no sería posible.

En algunas realizaciones, puede ser deseable acoplar más de una secuencia del polipéptido p97 a un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-Her2/neu), o viceversa. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se acoplan múltiples

secuencias del polipéptido p97 a una molécula de anticuerpo o fragmento de unión de la misma. En una realización, se acoplan múltiples secuencias del polipéptido p97 a una molécula de anticuerpo anti-Her2/neu o un fragmento de unión del mismo. Las secuencias del polipéptido p97 pueden ser iguales o diferentes. Independientemente de la realización particular, los conjugados que contienen múltiples secuencias del polipéptido p97 pueden prepararse en una diversidad de formas. Por ejemplo, puede acoplarse más de un polipéptido directamente a una molécula de anticuerpo, o pueden usarse enlazadores que proporcionan múltiples sitios para la unión. Puede emplearse cualquiera de una diversidad de estrategias de entrecruzamiento heterobifuncional conocidas para preparar conjugados de la invención. Se entenderá que muchas de estas realizaciones pueden conseguirse controlando las estequiometrías de los materiales usados durante el procedimiento de conjugación/entrecruzamiento.

En una realización más específica de la invención, se usa un agente de entrecruzamiento amina-sulfhidrilo para preparar un conjugado. En una realización preferida, por ejemplo, el agente de entrecruzamiento es 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) (Thermo Scientific), que es un agente de entrecruzamiento sulfhidrilo que contiene grupos reactivos de NHS-éster y maleimida en extremos opuestos de un brazo espaciador estabilizado con ciclohexano de longitud media (8,3 ángstrom). SMCC es un agente de entrecruzamiento no escindible y permeable en membrana que puede usarse para crear anticuerpos anti-Her2/neu reactivos a sulfhidrilo, activados con maleimida o fragmentos de unión a antígeno para una reacción posterior con secuencias del polipéptido p97. Los NHS ésteres reaccionan con las aminas primarias a pH 7-9 para formar enlaces amida estables. Las maleimidias reaccionan con grupos sulfhidrilo a pH 6,5-7,5 para formar enlaces tioéter estables. Por lo tanto, el NHS éster reactivo a amina de SMCC se entrecruza rápidamente con aminas primarias de un anticuerpo anti-Her2/neu y el grupo maleimida reactivo a sulfhidrilo resultante está disponible entonces para reaccionar con residuos de cisteína de p97 para producir los conjugados específicos de interés.

En ciertas realizaciones específicas, la secuencia del polipéptido p97 se modifica para contener grupos sulfhidrilo expuestos para facilitar el entrecruzamiento, por ejemplo, para facilitar el entrecruzamiento con un anticuerpo activado por maleimida, tal como un anticuerpo anti-Her2/neu. En una realización más específica, la secuencia del polipéptido p97 se modifica con un reactivo que modifica las aminas primarias para añadir grupos tiol sulfhidrilo protegidos. En una realización incluso más específica, se usa el reactivo N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) (Thermo Scientific) para producir polipéptidos p97 tiolados.

En otras realizaciones específicas, un anticuerpo activado por maleimida se hace reaccionar en las condiciones adecuadas con polipéptidos p97 tiolados para producir un conjugado de la presente invención. Se entenderá que manipulando las proporciones de SMCC, SATA, el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-Her2/neu) y el polipéptido p97 en estas reacciones, es posible producir conjugados que tengan diferentes estequiometrías, pesos moleculares y propiedades.

La estrategia de entrecruzamiento específica que se ha analizado anteriormente (e ilustrada a continuación) es sino uno de muchos ejemplos de estrategias de conjugación adecuadas que pueden emplearse en la producción de conjugados de la invención. Será evidente para los expertos en la técnica que pueden emplearse una diversidad de reactivos bifuncionales o polifuncionales diferentes, tanto homo como heterofuncionales (tales como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, IL), como el grupo enlazador. El acoplamiento puede realizarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o residuos carbohidrato oxidados. Existen numerosas referencias que describen tal metodología, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.671.958, de Rodwell y col.

En otras realizaciones ilustrativas, los conjugados incluyen grupos de unión, tales como los desvelados en la Pat. de Estados Unidos N° 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, y Chari y col., Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de unión ilustrativos incluyen, por ejemplo, grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos inestables en ácido, grupos fotoinestables, grupos inestables en esterasa.

Aún en otras realizaciones ilustrativas, los conjugados se preparan usando agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particulares incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]) y 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que

facilite la liberación de uno o más componentes escindibles. Por ejemplo, puede usarse un enlazador inestable en ácido (Cancer Research 52: 127-131 (1992); Pat. de Estados Unidos N° 5.208.020).

En otras realizaciones, se usan polímeros no proteínicos en un enlazador para acoplar una secuencia del polipéptido p97 a un anticuerpo Her2/neu. Estos pueden incluir, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol, polipropilenglicol.

Cuando un componente de un conjugado puede ser más potente al estar libre del conjugado, puede ser deseable usar un grupo enlazador que sea escindible durante o tras la internalización en una célula. Se han descrito varios grupos de enlazador escindible diferentes. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente de estos grupos enlazador incluye la escisión por reducción de un enlace disulfuro (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.489.710, de Spitler), por irradiación de un enlace fotoinestable (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.625.014, de Senter y col.), por hidrólisis de cadenas laterales aminoácidas derivatizadas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.638.045, de Kohn y col.), por hidrólisis mediada por complemento sérico (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.671.958, de Rodwell y col.), e hidrólisis catalizada por ácido (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.569.789, de Blattler y col.).

Algunas realizaciones pueden emplear una o más etiquetas de aldehído para facilitar la conjugación entre un polipéptido p97 y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo (véanse las Patentes de Estados Unidos N° 8.097.701 y 7.985.783, incorporadas por referencia). Aquí, la modificación enzimática en un motivo de sulfatasa de la etiqueta de aldehído a través de la acción de una enzima de generación de formilglicina (FGE) genera un residuo de formilglicina (FGly). El resto aldehído del residuo de FGly puede aprovecharse después como un asa química para el sitio de unión específico de un resto de interés con respecto al polipéptido. En algunos aspectos, el resto de interés es otro polipéptido, tal como un anticuerpo.

Por lo tanto, las realizaciones particulares incluyen un polipéptido p97 o anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo anti-Her2/neu) que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más motivos de sulfatasa heterólogos, donde el motivo comprende la siguiente estructura:

$X_1Z_1X_2Z_2X$ (SEQ ID NO: 6)

donde Z_1 es cisteína o serina; Z_2 es un residuo de prolina o alanina; X_1 está presente o ausente y, cuando está presente, es cualquier aminoácido, donde X_1 está preferiblemente presente cuando el motivo de sulfatasa heterólogo está en un extremo N del polipéptido marcado con aldehído; y cada uno de X_2 y X_3 es independientemente cualquier aminoácido.

Los polipéptidos con el motivo que se ha descrito anteriormente pueden modificarse por una enzima FGE para generar un motivo que tenga un residuo de FGly, que, como se ha indicado anteriormente, puede usarse entonces para el sitio de unión específico de un segundo polipéptido, por ejemplo, a través de un resto enlazador. Dichas modificaciones pueden realizarse, por ejemplo, expresando el polipéptido que contiene el motivo de sulfatasa (por ejemplo, p97, anticuerpo) en un mamífero, levadura o célula bacteriana que expresa una enzima FGE o por modificación *in vitro* del polipéptido aislado con una enzima FGE aislada (véase Wu y col., PNAS. 106: 3000-3005, 2009; Rush y Bertozzi, J. Am Chem Soc. 130: 12240-1, 2008; y Carlson y col., J Biol Chem. 283: 20117-25, 2008).

Por lo tanto, algunas realizaciones incluyen un polipéptido p97 o anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno) que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más motivos de sulfatasa heterólogos que tienen un residuo de formilglicina, donde el motivo comprende la siguiente estructura:

$X_1(\text{FGly})X_2Z_2X_3$ (SEQ ID NO: 5)

donde FGly es un residuo de formilglicina; Z_2 es un residuo de prolina o alanina; X_1 está presente o ausente y, cuando está presente, es cualquier aminoácido, donde X_1 está presente preferiblemente cuando el motivo de sulfatasa heterólogo está en un extremo N del polipéptido marcado con aldehído; y cada uno de X_2 y X_3 es independientemente cualquier aminoácido.

En realizaciones particulares, cada uno de X_1 , X_2 y X_3 es independientemente un aminoácido alifático, un aminoácido que contiene azufre, o un aminoácido polar no cargado. Por ejemplo, X_1 puede ser L, M, V, S o T; y X_2 , y/o X_3 pueden ser independientemente S, T, A, V, G o C.

- En algunas realizaciones, el motivo o motivos de sulfatasa heterólogos pueden (a) tener menos de 16 residuos aminoacídicos de longitud, incluyendo aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos de longitud, (b) estar situados en el extremo N del polipéptido, (c) estar situados en el extremo C del polipéptido, (d) estar situados en un sitio interno de una secuencia aminoacídica nativa para el polipéptido, (e) estar situados en un bucle terminal del polipéptido, (f) estar situados en un sitio de modificación post-traducciona del polipéptido (por ejemplo, sitio de glicosilación), o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones específicas, el anticuerpo que comprende uno o más motivos de sulfatasa heterólogos se une específicamente a Her2/neu humano (por ejemplo, Trastuzumab).
- 10 Algunas realizaciones se refieren a conjugados de (i) un polipéptido p97 que contiene un motivo de sulfatasa (o etiqueta de aldehído), y (ii) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que está funcionalizado con un grupo reactivo aldehído, o viceversa, donde (i) e (ii) se unen covalentemente a través del residuo de FGly del motivo de sulfatasa y el grupo reactivo aldehído. Dichos conjugados pueden tener una de las siguientes estructuras:

15 p97(FGly)-R₁-Ab o p97-R₁-(FGly)Ab

donde R₁ es al menos un enlace reactivo de aldehído; y FGly es un residuo de formilglicina en una sulfatasa heteróloga.

- 20 La proteína que contiene una etiqueta distinta de aldehído (por ejemplo, anticuerpo, polipéptido p97) puede funcionalizarse con uno o más grupos reactivos aldehído tales como aminooxi, hidrazida y tiosemicarbazida, y después unirse covalentemente al polipéptido que contiene una etiqueta de aldehído a través del al menos un residuo de FGly, para formar un enlace reactivo aldehído. La unión de una proteína funcionalizada aminooxi crea un enlace oxima entre el residuo FGly y la proteína funcionalizada; la unión de una proteína funcionalizada con hidrazida crea un enlace hidrazina entre el residuo FGly y la proteína funcionalizada; y la unión de una proteína funcionalizada con tiosemicarbazida crea un enlace hidrazina carbotiamida entre el residuo FGly y la proteína funcionalizada.

- Ciertas realizaciones incluyen conjugados de (i) un polipéptido p97 que contiene un motivo de sulfatasa (o etiqueta de aldehído) y (ii) un anticuerpo que contiene un motivo de sulfatasa (o etiqueta de aldehído), donde (i) e (ii) se unen covalentemente a través de sus residuos FGly respectivos, opcionalmente mediante un resto enlazador bifuncionalizado. Por ejemplo, ciertos conjugados de p97-anticuerpo pueden comprender la siguiente estructura:

35 p97(FGly)-R₁-L-R₂-(FGly)Ab

- donde R₁ y R₂ son el mismo o diferente enlace reactivo de aldehído; L es un resto enlazador, p97(FGly) es un polipéptido p97 que contiene una etiqueta de aldehído, y (FGly)Ab es un anticuerpo que contiene una etiqueta de aldehído, tal como un anticuerpo que se une específicamente a Her2/neu humano (por ejemplo, Trastuzumab). Simplemente a modo de ilustración, en algunas realizaciones, el al menos un motivo de sulfatasa heterólogo puede estar en el extremo C del polipéptido p97 y el extremo N del anticuerpo. En otras realizaciones, el al menos un motivo de sulfatasa heterólogo puede estar en el extremo N del polipéptido p97 y el extremo C del anticuerpo. Aún en otras realizaciones, el al menos un motivo de sulfatasa heterólogo puede estar en el extremo N del polipéptido p97 y el extremo N del anticuerpo. En realizaciones adicionales, el al menos un motivo de sulfatasa heterólogo puede estar en el extremo C del polipéptido p97 y el extremo C del anticuerpo. Como se ha indicado anteriormente, el al menos un motivo heterólogo puede estar en una posición interna en el polipéptido p97 y/o el anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que son posibles otras combinaciones.

- Los enlaces reactivos aldehído de R₁ y R₂ pueden formarse independientemente por cualquier grupo reactivo aldehído que formará un enlace covalente entre (i) el residuo de formilglicina (FGly) de la etiqueta de aldehído y (ii) un resto enlazador que está funcionalizado con dicho grupo reactivo aldehído (por ejemplo, un enlazador bifuncionalizado con dos grupos reactivos aldehído, que pueden ser iguales o diferentes). Los ejemplos de grupos reactivos aldehído incluyen grupos aminooxi, hidrazida y tiosemicarbazida, que formarán enlaces que contienen base de Schiff con un residuo FGly, incluyendo enlaces oxima, enlaces hidrazina, y enlaces hidrazina carbotiamida, respectivamente. Por lo tanto, R₁ y R₂ pueden ser independientemente un enlace que comprende una base de Schiff, tal como un enlace oxima, un enlace hidrazina, o un enlace hidrazina carbotiamida.

En algunas realizaciones, el polipéptido p97 que contiene una etiqueta de aldehído y el anticuerpo que contiene una etiqueta de aldehído están unidos (por ejemplo, unidos covalentemente) a través de un enlazador multifuncionalizado (por ejemplo, un enlazador bifuncionalizado), estando este último funcionalizado con el mismo o

- los mismos, o diferente o diferentes, grupos reactivos aldehído. En estas realizaciones y relacionadas, los grupos reactivos aldehído permiten al enlazador formar un puente covalente entre el polipéptido p97 y el anticuerpo a través de sus residuos FGly respectivos. Los restos enlazadores incluyen cualquier resto o producto químico que pueda funcionalizarse y, preferiblemente, bi o multifuncionalizarse con uno o más grupos reactivos aldehído. Los ejemplos particulares incluyen péptidos, polímeros solubles en agua, etiquetas detectables, otros compuestos terapéuticos (por ejemplo, compuestos citotóxicos), restos de biotina/estreptavidina, y glicanos (véase Hudak y col., J Am Chem Soc. 133: 16127-35, 2011). Los ejemplos específicos de glicanos (o glicósidos) incluyen aminooxi glicanos, tales como glicanos de mayor orden compuestos por intermedios de *N*-pentenoil hidroxamatos de glicosilo (anteriormente).
- 10 A continuación se describen enlazadores peptídicos (o espaciadores). Los enlazadores peptídicos pueden funcionalizarse con grupos reactivos aldehído de acuerdo con técnicas rutinarias en la técnica (véase, por ejemplo, Carrico y col., Nat Chem Biol. 3: 321-322, 2007).
- 15 Un "polímero soluble en agua" se refiere a un polímero que es soluble en agua y normalmente es sustancialmente no inmunógeno, y normalmente tiene un peso molecular atómico de más de aproximadamente 1.000 Daltons. La unión de dos polipéptidos a través de un polímero soluble en agua puede ser deseable, ya que dicha modificación o modificaciones pueden aumentar el índice terapéutico aumentando la semivida en suero, por ejemplo, aumentando la estabilidad proteolítica y/o disminuyendo la eliminación renal. Adicionalmente, la unión a través de uno o más
- 20 polímeros puede reducir la inmunogenicidad de los productos farmacéuticos de proteínas.

En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua tiene un peso molecular hidrodinámico eficaz de más de aproximadamente 10.000 Da, más de aproximadamente 20.000 a 500.000 Da, más de aproximadamente 40.000 Da a 300.000 Da, más de aproximadamente 50.000 Da a 70.000 Da, normalmente más de aproximadamente

25 60.000 Da. El "peso molecular hidrodinámico eficaz" se refiere al tamaño solvatado en agua eficaz de una cadena polimérica según se determina por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) basada en productos acuoso. Cuando el polímero soluble en agua contiene cadenas poliméricas que tienen unidades de repetición de óxido de polialquileno, tal como unidades de repetición de óxido de etileno, cada cadena puede tener un peso molecular atómico de entre aproximadamente 200 Da y aproximadamente 80.000 Da, o entre aproximadamente 1,500 Da y

30 aproximadamente 42,000 Da, siendo de 2.000 a aproximadamente 20.000 Da de interés particular. También se incluyen polímeros solubles en agua lineales, ramificados y terminalmente cargados.

Los polímeros útiles como enlazadores entre polipéptidos marcado con aldehído pueden tener un amplio intervalo de pesos moleculares, y subunidades poliméricas. Estas subunidades pueden incluir un polímero biológico, un polímero

35 sintético, o una combinación de los mismos. Los ejemplos de dichos polímeros solubles en agua incluyen: dextrano y derivados de dextrano, incluyendo sulfato de dextrano, dextrina entrecruzada con P-amino, y carboximetil dextrina, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y dextrinas, y derivados e hidrolatos de almidón, polialquilenglicol y derivados del mismo, incluyendo polietilenglicol (PEG), metoxipolietilenglicol, homopolímeros de polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de

40 etilenglicol con propilenglicol, en los que dichos homopolímeros y copolímeros están sin sustituir o sustituidos en un extremo con un grupo alquilo, heparina y fragmentos de heparina, alcohol polivinílico y polivinil etil éteres, polivinilpirrolidona, aspartamida, y polioles polioxiethylados, con el dextrano y derivados de dextrano, dextrina y derivados de dextrina. Se apreciará que también se incluyen diversos derivados de los polímeros solubles en agua descritos específicamente.

45 Se conocen en la técnica polímeros solubles en agua, particularmente los polímeros basados en óxido de polialquileno tales como polietilenglicol "PEG" (véase, Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Ed., Plenum Press, Nueva York, N.Y. (1992); y Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications, J. M. Harris y S. Zalipsky, Eds., ACS (1997); y las Solicitudes de Patente Internacional: WO

50 90/13540, WO 92/00748, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28937, WO 95/11924, WO 96/00080, WO 96/23794, WO 98/07713, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/30727, WO 99/32134, WO 99/33483, WO 99/53951, WO 01/26692, WO 95/13312, WO 96/21469, WO 97/03106, WO 99/45964, y las Pat. de Estados Unidos N° 4.179.337; 5.075.046; 5.089.261; 5.100.992; 5.134.192; 5.166.309; 5.171.264; 5.213.891; 5.219.564; 5.275.838; 5.281.698; 5.298.643; 5.312.808; 5.321.095; 5.324.844; 5.349.001; 5.352.756;

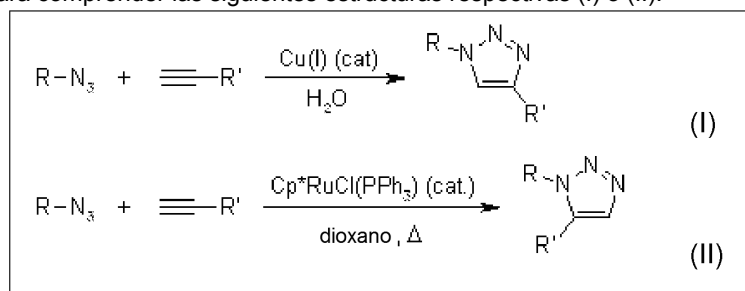
55 5.405.877; 5.455.027; 5.446.090; 5.470.829; 5.478.805; 5.567.422; 5.605.976; 5.612.460; 5.614.549; 5.618.528; 5.672.662; 5.637.749; 5.643.575; 5.650.388; 5.681.567; 5.686.110; 5.730.990; 5.739.208; 5.756.593; 5.808.096; 5.824.778; 5.824.784; 5.840.900; 5.874.500; 5.880.131; 5.900.461; 5.902.588; 5.919.442; 5.919.455; 5.932.462; 5.965.119; 5.965.566; 5.985.263; 5.990.237; 6.011.042; 6.013.283; 6.077.939; 6.113.906; 6.127.355; 6.177.087; 6.180.095; 6.194.580; 6.214.966, que se incorporan por referencia).

- Los polímeros ejemplares de interés incluyen aquellos que contienen un óxido de polialquileno, óxido de poliamida alquileno, o derivados de los mismos, incluyendo óxido de polialquileno y óxido de poliamida alquileno que comprenden una unidad de repetición de óxido de etileno de la fórmula $-(CH_2-CH^2-O)-$. Los polímeros ejemplares
5 adicionales de interés incluyen una poliamida que tiene un peso molecular de más de aproximadamente 1,000 Daltons de la fórmula $-[C(O)-X-C(O)-NH-Y-NH]_n-$ o $-[NH-Y-NH-C(O)-X-C(O)]_n-$, donde X e Y son radicales divalentes que pueden ser iguales o diferentes y pueden ser ramificados o lineales, y n es un número entero discreto de 2-100, normalmente de 2 a 50, y donde cualquiera o ambos de X e Y comprenden una unidad de repetición soluble en agua biocompatible, sustancialmente no antigénica que puede ser lineal o ramificada.
- 10 Las unidades de repetición solubles en agua ejemplares comprenden un óxido de etileno de la fórmula $-(CH_2-CH_2-O)-$ o $-(CH_2-CH_2-O)-$. El número de dichas unidades de repetición solubles en agua puede variar significativamente, siendo el número habitual de dichas unidades de 2 a 500, de 2 a 400, de 2 a 300, de 2 a 200, de 2 a 100, y mucho más habitualmente de 2 a 50. Una realización ejemplar es una en la que uno o ambos de X e Y se
15 seleccionan entre: $-((CH_2)_{n1}-(CH_2-CH_2-O)_{n2}-(CH_2)-$ o $-((CH_2)_{n1}-(O-CH_2-CH_2)_{n2}-(CH_2)_{n1}-)$, donde n1 es de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4 y mucho más habitualmente de 1 a 3, y donde n2 es de 2 a 50, de 2 a 25, de 2 a 15, de 2 a 10, de 2 a 8, y mucho más habitualmente de 2 a 5. Una realización ejemplar adicional es una en la que X es $-(CH_2-CH_2)-$, y donde Y es $-(CH_2-(CH_2-CH_2-O)_3-CH_2-CH_2-CH_2)-$ o $-(CH_2-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_3-CH_2)-$, entre otras variaciones.
- 20 Para los restos de biotina/estreptavidina (o avidina), el polipéptido p97 que contiene una o más etiquetas de aldehído puede unirse covalentemente a través de un residuo FGly a una molécula de biotina que está funcionalizada con un grupo reactivo aldehído, y el anticuerpo que contiene una o más etiquetas de aldehído puede unirse covalentemente a través de un residuo FGly a una molécula de estreptavidina que está funcionalizada con un grupo reactivo
25 aldehído, o viceversa. Después, el p97-biotina (o estreptavidina) puede mezclarse con el anticuerpo-estreptavidina (o biotina) para formar un conjugado de p97-anticuerpo a través de la fuerte interacción entre la biotina y la estreptavidina.
- Los conjugados de p97-anticuerpo también pueden prepararse mediante diversas técnicas de "química clic",
30 incluyendo reacciones que son modulares, de gran alcance, dan rendimientos muy altos, generan subproductos principalmente inofensivos que pueden eliminarse por métodos cromatográficos, y pueden ser estereoespecíficas, pero no necesariamente enantioselectivas (véase Kolb y col., *Angew Chem Int Ed Engl.* 40: 2004-2021, 2001). Los ejemplos particulares incluyen técnicas de conjugación que emplean la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen de azidas y alquinos, también denominada como reacciones de "cicloadición de azida-alquino" (véase Hein y col., *Pharm Res.*
35 25: 2216-2230, 2008). Los ejemplos no limitantes de reacciones de cicloadición de azida-alquino incluyen reacciones de cicloadición de azida-alquino catalizadas por cobre (CuAAC) y reacciones de cicloadición de azida-alquino catalizadas por rutenio (RuAAC).
- La CuAAC funciona en amplio rango de temperatura, es insensible a las condiciones acuosas y un rango de pH
40 sobre 4 a 12, y tolera una amplia gama de grupos funcionales (véase Himo y col., *JAm Chem Soc.* 127: 210-216, 2005). El catalizador de Cu(I) activo puede generarse, por ejemplo, a partir de sales de Cu(I) o sales de Cu(II) usando ascorbato sódico como agente reductor. Esta reacción forma productos 1,4-sustituidos, haciéndola específica de región (véase Hein y col., anteriormente).
- 45 RuAAC utiliza complejos de cloruro de pentametilciclopentadienilo rutenio $[Cp^*RuCl]$ que pueden catalizar la cicloadición de azidas a alquinos terminales, conduciendo de forma regioselectiva a 1,2,3-triazoles 1,5-disustituidos (véase, Rasmussen y col., *Org. Lett.* 9: 5337-5339, 2007). Adicionalmente, y a diferencia de CuAAC, RuAAC también puede usarse con alquinos internos para proporcionar 1,2,3-triazoles completamente sustituidos.
- 50 Por lo tanto, ciertas realizaciones incluyen polipéptidos p97 que comprenden al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral azida o una cadena lateral alquino, incluyendo aminoácidos sintéticos internos y terminales (por ejemplo, N-terminales, C-terminales). Algunos de estos polipéptidos p97 pueden formarse mediante una incorporación *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, sistemas libres de células) de aminoácidos sintéticos que contienen cadenas laterales azida o cadenas laterales alquino. Las técnicas ejemplares *in vivo* incluyen técnicas de cultivo
55 celular, por ejemplo, usando *E. coli* modificado (véase Travis y Schultz, *The Journal of Biological Chemistry.* 285: 11039-44, 2010; y Deiters y Schultz, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 15: 1521-1524, 2005), y técnicas ejemplares *in vitro* incluyen sistemas libres de células (véase Bundy, *Bioconj Chem.* 21: 255-63, 2010).

En algunas realizaciones, un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena

lateral azida se conjuga por cicloadición de azida-alquino con un anticuerpo que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral alquino. En otras realizaciones, un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral alquino se conjuga mediante cicloadición de azida-alquino con un anticuerpo que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral azida. Por lo tanto, algunas realizaciones incluyen conjugados que comprenden un polipéptido p97 unido covalentemente a un anticuerpo a través de una unión de 1,2,3-triazol. El anticuerpo es un anticuerpo anti-Her2/neu, tal como Trastuzumab.

Los conjugados específicos de p97-anticuerpo pueden formarse por las siguientes reacciones basadas en CuAAC o basadas en RuAAC, para comprender las siguientes estructuras respectivas (I) o (II):



10

donde R es un polipéptido p97 y R¹ es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; donde R es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y R¹ es un polipéptido p97.

15 Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones, el aminoácido sintético con la cadena lateral azida y/o el aminoácido sintético con la cadena lateral alquino son aminoácidos terminales (N-terminal, C-terminal). En ciertas realizaciones, uno o más de los aminoácidos sintéticos son internos. Las realizaciones específicas incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido sintético N-terminal con una cadena lateral azida conjugado con un anticuerpo que comprende un aminoácido sintético N-terminal con una cadena lateral alquino. Otras realizaciones incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido sintético C-terminal con una cadena lateral azida conjugado con un anticuerpo que comprende un aminoácido sintético C-terminal con una cadena lateral alquino. Aún otras realizaciones incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido sintético N-terminal con una cadena lateral azida conjugado con un anticuerpo que comprende un aminoácido sintético C-terminal con una cadena lateral alquino. Realizaciones adicionales incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido sintético C-terminal con una cadena lateral azida conjugado con un anticuerpo que comprende un aminoácido sintético N-terminal con una cadena lateral alquino.

Otras realizaciones incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido sintético N-terminal con una cadena lateral alquino conjugado con un anticuerpo que comprende un aminoácido sintético N-terminal con una cadena lateral azida. Aún realizaciones adicionales, incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido sintético C-terminal con una cadena lateral alquino conjugado con un anticuerpo que comprende un aminoácido sintético C-terminal con una cadena lateral azida. Realizaciones adicionales incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido sintético N-terminal con una cadena lateral alquino conjugado con un anticuerpo que comprende un aminoácido sintético C-terminal con una cadena lateral azida. Aún realizaciones adicionales incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido sintético C-terminal con una cadena lateral alquino conjugado con un anticuerpo que comprende un aminoácido sintético N-terminal con una cadena lateral azida.

También se incluyen métodos para producir un conjugado de p97-anticuerpo, que comprende: (a) realizar una reacción de cicloadición azida-alquino entre (i) un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral azida y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral alquino; o (ii) un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral alquino y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos un aminoácido sintético con una cadena lateral azida; y (b) aislar un conjugado de p97-anticuerpo de la reacción, produciendo de esta manera un conjugado de p97-anticuerpo.

En el caso en el que el conjugado de p97-anticuerpo sea un polipéptido de fusión, el polipéptido de fusión puede prepararse generalmente usando técnicas convencionales, incluyendo conjugación química. Preferiblemente, sin embargo, se expresa un polipéptido de fusión como un polipéptido recombinante en un sistema de expresión, como se describe a continuación. Los polipéptidos de fusión de la invención pueden contener una o múltiples copias de

una secuencia del polipéptido p97 y pueden contener una o múltiples copias de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, anticuerpo anti-Her2/neu o un fragmento de unión a antígeno del mismo), presente en cualquier disposición deseada.

- 5 Puede emplearse una secuencia de enlazador peptídico para separar los primeros y segundos componentes polipeptídicos una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundarias y terciarias. Tal secuencia de enlazador peptídico puede incorporarse al polipéptido de fusión usando técnicas convencionales ya conocidas en la técnica. Las secuencias de enlazador peptídico adecuadas pueden escogerse basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su capacidad para adoptar una estructura secundaria que pueda interactuar con epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptidos; y (3) la falta de residuos hidrófobos o cargados que puedan reaccionar con los epítomos funcionales de los polipéptidos. Las secuencias aminoacídicas que pueden emplearse de forma útil como enlazadores incluyen las desveladas en Maratea y col., Gene 40: 39-46, 1985; Murphy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8258-8262, 1986; Patente de Estados Unidos N° 4.935.233 y Patente de Estados Unidos N° 4.751.180.
- 10 La secuencia de enlazador puede tener generalmente de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Las secuencias enlazadoras no se requieren cuando el primer y segundo polipéptidos tienen regiones aminoacídicas N-terminales no esenciales que puedan usarse para separar los dominios funcionales e impedir la interferencia estérica.
- 20 En ciertas realizaciones ilustrativas, un espaciador peptídico está entre 1 a 5 aminoácidos, entre 5 a 10 aminoácidos, entre 5 a 25 aminoácidos, entre 5 a 50 aminoácidos, entre 10 a 25 aminoácidos, entre 10 a 50 aminoácidos, entre 10 a 100 aminoácidos, o cualquier rango intermedio de aminoácidos. En otras realizaciones ilustrativas, un espaciador peptídico comprende aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos de longitud. Los enlazadores particulares pueden tener una longitud aminoacídica total de aproximadamente 1-200 aminoácidos, 1-150 aminoácidos, 1-100 aminoácidos, 1-90 aminoácidos, 1-80 aminoácidos, 1-70 aminoácidos, 1-60 aminoácidos, 1-50 aminoácidos, 1-40 aminoácidos, 1-30 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-5 aminoácidos, 1-4 aminoácidos, 1-3 aminoácidos, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos.
- 30 Un enlazador peptídico puede emplear uno cualquier o más aminoácidos de origen natural, uno o más aminoácidos de origen sintético, análogos de aminoácidos, y/o miméticos de aminoácidos como se describen en otra parte del presente documento y se conocen en la técnica. Ciertas secuencias aminoacídicas que pueden emplearse de forma útil como enlazadores incluyen las desveladas en Maratea y col., Gene 40: 39-46, 1985; Murphy y col., PNAS USA.
- 35 83: 8258-8262, 1986; Pat. de Estados Unidos N° 4.935.233 y la Pat. de Estados Unidos N° 4.751.180. Las secuencias de enlazador peptídico particulares contienen residuos Gly, Ser y/o Asn. También pueden emplearse, si se desea, otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala, en la secuencia de enlazador peptídico.
- Ciertos enlazadores ejemplares incluyen enlazadores que contienen Gly, Ser y/o Asn, como se indica a continuación: enlazadores [G]_x, [S]_x, [N]_x, [GS]_x, [GGS]_x, [GSS]_x, [GSGS]_x (SEQ ID NO: 7), [GGSG]_x (SEQ ID NO: 8), [GGGS]_x (SEQ ID NO: 9), [GGGGS]_x (SEQ ID NO: 10), [GN]_x, [GGN]_x, [GNN]_x, [GNGN]_x (SEQ ID NO: 11), [GGNG]_x (SEQ ID NO: 12), [GGGN]_x (SEQ ID NO: 13), [GGGGN]_x (SEQ ID NO: 14), donde x es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más. Otras combinaciones de estos aminoácidos y relacionados serán evidentes para los expertos en la técnica.
- 45 En realizaciones específicas, la secuencia de enlazador comprende una secuencia de enlazador Gly₃, que incluye tres residuos de glicina. En realizaciones particulares, los enlazadores flexibles pueden diseñarse usando un programa informático capaz de diseñar tanto los sitios de unión a ADN como los propios péptidos (Desjarlais & Berg, PNAS. 90: 2256-2260, 1993; y PNAS. 91: 11099-11103, 1994) o por métodos de expresión en fagos.
- 50 Los enlazadores péptidos pueden ser fisiológicamente estables o pueden incluir un enlazador liberable, tal como un enlazador fisiológicamente degradable o enzimáticamente escindible (por ejemplo, un enlazador proteolíticamente escindible). En ciertas realizaciones, uno o más enlazadores escindibles pueden dar como resultado una semivida más corta y una eliminación más rápida del conjugado. Estas realizaciones y relacionadas pueden usarse, por ejemplo, para mejorar la solubilidad y la durabilidad de circulación en sangre de los conjugados de p97-anticuerpo
- 55 en el torrente sanguíneo, mientras que también se administra un anticuerpo al torrente sanguíneo (o a través de la BHE) que, posterior a la degradación del enlazador, está sustancialmente libre de la secuencia p97. Estos aspectos son especialmente útiles en aquellos casos en los que los anticuerpos, cuando se conjugan permanentemente con una secuencia p97, demuestran una actividad reducida. Usando los enlazadores que se proporcionan en el presente

documento, dichos anticuerpos pueden mantener su actividad terapéutica cuando están en forma conjugada. En estas y otras maneras, las propiedades de los conjugados de p97-anticuerpo pueden adaptarse más eficazmente para equilibrar la bioactividad y la semivida circulante de los anticuerpos con el tiempo.

- 5 En realizaciones particulares, un enlazador liberable tiene una semivida a pH 7,4, 25 °C, por ejemplo, un pH fisiológico, una temperatura corporal de ser humano (por ejemplo, *in vivo*, en suero, en un tejido dado), de aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, 10 aproximadamente 72 horas, o aproximadamente 96 horas o más, o cualquier semivida intermedia. Un experto en la técnica apreciará que la semivida de un conjugado de p97-anticuerpo puede adaptarse finamente usando un enlazador liberable particular.

- En ciertas realizaciones, sin embargo, uno cualquiera o más de los enlazadores peptídicos son opcionales. Por 15 ejemplo, las secuencias de enlazador pueden no requerirse cuando el primer y segundo polipéptidos tienen regiones aminoácidas N-terminal y/o C-terminal no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales e impedir la interferencia estérica.

- En otras realizaciones, un conjugado de p97-anticuerpo, como se describe en el presente documento, puede 20 conjugarse adicionalmente o unirse operativamente a otro compuesto terapéutico. El conjugado puede incluir, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una citocina, un agente anti-angiogénico, un inhibidor de tirosina cinasa, una toxina, un radioisótopo, u otro agente terapéuticamente activo.

POLINUCLEÓTIDOS DE FUSIÓN, CÉLULAS HUÉSPED Y PRODUCCIÓN RECOMBINANTE

- 25 La presente invención proporciona adicionalmente en ciertas realizaciones polipéptidos p97 que codifican polinucleótidos aislados y conjugados de p97-anticuerpo de la invención, tal como un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo anti-Her2/neu o fragmento de unión a antígeno y una secuencia del polipéptido p97 o fragmento o derivado del mismo. También se incluyen polinucleótidos aislados o recombinantes que codifican 30 polipéptidos p97 y anticuerpos que contienen una etiqueta de aldehído, y polipéptidos p97 y anticuerpos que comprenden al menos un aminoácido sintético, por ejemplo, aminoácidos sintéticos con una cadena lateral azida o cadena lateral alquino, y células huésped relacionadas. Estas realizaciones y relacionadas pueden usarse para la producción recombinante de las proteínas de fusión de p97-anticuerpo y conjugados de no fusión descritos en el presente documento.

- 35 Para las proteínas de fusión, las secuencias de ADN que codifican los componentes p97 y el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-Her2/neu) pueden ensamblarse por separado, y después pueden ligarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipeptídico está ligando, con o sin un enlazador peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente 40 polipeptídico de manera que los marcos de lectura de las secuencias estén en fase. Las secuencias de ADN ligadas están unidas operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión de ADN se encuentran únicamente 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De forma similar, los codones de terminación requeridos para las señales de terminación de traducción y transcripción finales están únicamente presentes 3' con respecto a la secuencia de ADN 45 que codifica el segundo polipéptido. Esto permite la traducción a un único polipéptido de fusión que conserva la actividad biológica de ambos polipéptidos del componente.

- Pueden aplicarse técnicas similares, principalmente la disposición de los elementos reguladores tales como 50 promotores, codones de terminación, y señales de terminación de la transcripción, a la producción recombinante de proteínas de no fusión, por ejemplo, polipéptidos p97 y anticuerpos para la producción de conjugados de no fusión.

- Los polinucleótidos y polinucleótidos de fusión de la invención pueden contener una o múltiples copias de un ácido nucleico que codifica una secuencia del polipéptido p97, y/o pueden contener una o múltiples copias de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

- 55 En algunas realizaciones, se introducen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido p97 objeto, anticuerpo, y/o fusión p97-anticuerpo directamente en una célula huésped, y la célula se incuba en condiciones suficientes para inducir la expresión del polipéptido o polipéptidos codificados. Las secuencias polipeptídicas de esta divulgación pueden prepararse usando técnicas convencionales ya conocidas por los expertos en la técnica junto con las

secuencias polipeptídicas y de ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento.

Por lo tanto, de acuerdo con ciertas realizaciones relacionadas, se proporciona una célula huésped recombinante que comprende un polinucleótido o un polinucleótido de fusión como se describe en el presente documento. La expresión de un polipéptido p97, anticuerpo, o fusión p97-anticuerpo en la célula huésped puede conseguirse convenientemente cultivando en las condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el polinucleótido. Tras la producción por expresión, el polinucleótido o polinucleótidos pueden aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y después usarse según se desee.

10 Se conocen bien sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células huésped diferentes. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células mamíferas, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido, células HEK-293, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un huésped bacteriano preferido común es *E. coli*.

La expresión de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno en células procariotas, tal como *E. coli*, se establece bien en la técnica. Para una revisión, véase, por ejemplo, Pluckthun, A. *Bio/Technology*. 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como una opción para la producción de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, véanse revisiones recientes, por ejemplo, Ref, M. E. (1993) *Curr. Opinion Biotech*. 4: 573-576; Trill J. J. y col. (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560.

Los vectores adecuados pueden escogerse o construirse, conteniendo las secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias de promotor, secuencias de terminador, secuencias de poliadenilación, secuencias de potenciador, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, víricos, por ejemplo, fago, o fagémidos, según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook y col., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción ADN en las células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons, 1992, o actualizaciones posteriores del mismo.

El término "célula huésped" se usa para hacer referencia a una célula en la que se ha introducido, o que puede tener introducida en la misma, una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más de los polipéptidos descritos en el presente documento, y que expresa adicionalmente, o es capaz de expresar, un gen seleccionado de interés, tal como un gen que codifica cualquier polipéptido descrito en el presente documento. El término incluye la progenie del precursor, ya sea la progenie idéntica o no en morfología o en patrimonio genético al precursor original, siempre que esté presente el gen seleccionado. Las células huésped pueden escogerse por ciertas características, por ejemplo, la expresión de una enzima de generación de formilglicina (FGE) para convertir un residuo de cisteína o serina dentro de un motivo de sulfatasa en un residuo de formilglicina (FGly), o la expresión de una o más aminoacil ARNt sintetasas que pueden incorporar aminoácidos sintéticos en el polipéptido, incluyendo aminoácidos sintéticos con una cadena lateral azida, una cadena lateral alquino, u otra cadena lateral deseada, para facilitar la conjugación.

Por consiguiente, también se contempla un método que comprende introducir dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección fosfato cálcico, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposoma y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación de cloruro cálcico, electroporación, y transfección usando bacteriófago. La introducción puede seguirse de causar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células huésped en condiciones para expresión del gen. En una realización, el ácido nucleico se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración puede promoverse por inclusión de las secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

La presente invención también proporciona, en ciertas realizaciones, un método que comprende usar una construcción como se ha indicado anteriormente en un sistema de expresión para expresar un polipéptido particular, tal como un polipéptido p97, anticuerpo, o proteína de fusión p97-anticuerpo como se describe en el presente documento.

De forma ilustrativa, puede emplearse una secuencia de enlazador peptídico/espaciador para separar los componentes de una proteína de fusión p97-anticuerpo en una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundarias y/o terciarias, si se desea. Tal secuencia de enlazador peptídico puede incorporarse a un polipéptido de fusión usando técnicas convencionales ya conocidas en la técnica.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO

La presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden los conjugados de p97-anticuerpo y composiciones de la invención y la administración de dichas composiciones para fines terapéuticos.

La administración de los conjugados descritos en el presente documento, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, puede realizarse a través de cualquiera de los modos aceptados de administración de agentes que sirvan para utilidades similares. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse combinando un conjugado o una composición que contiene un conjugado con un vehículo, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable apropiado, y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semi-sólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Además, otros principios farmacéuticamente activos (incluyendo otros agentes anticancerosos como se describe en otra parte en el presente documento) y/o excipientes adecuados, tales como sales, tampones y estabilizadores pueden, pero no es necesario, estar presentes en la composición. La administración puede conseguirse mediante una diversidad de rutas diferentes, incluyendo oral, parenteral, nasal, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica. Los modos de administración preferidos dependen de la naturaleza de la afección que se va a tratar o prevenir. Una cantidad que, tras la administración, reduce, inhibe, previene o retrasa el avance y/o metástasis de un cáncer se considera eficaz.

Los vehículos pueden incluir, por ejemplo, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone al mismo a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución tamponada de pH acuoso. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; incluyendo los antioxidantes ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tal como manitol o sorbitol; contraiones de formación de sales, tal como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como polisorbato 20 (TWEEN™) polietilenglicol (PEG) y poloxámeros (PLURONICS™),

La presente invención proporciona composiciones terapéuticas que comprenden una secuencia del polipéptido p97 y cualquier anticuerpo terapéutico y/o de diagnóstico o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento que se une específicamente a la proteína Her2/neu humana u otro anticuerpo descrito en el presente documento).

En ciertos aspectos, la secuencia del polipéptido p97 y el anticuerpo o fragmento del mismo, individualmente o como un conjugado preexistente, se unen cada uno a o se encapsulan en una partícula, por ejemplo, una nanopartícula, perla, formulación lipídica, partícula lipídica o liposoma, por ejemplo, un inmunoliposoma. Por ejemplo, en realizaciones particulares, la secuencia del polipéptido p97 se une a la superficie de una partícula, y el anticuerpo o fragmento del mismo se une a la superficie de la partícula y/o se encapsula en la partícula. En algunas de estas realizaciones y relacionadas, el polipéptido p97 y el anticuerpo se unen covalentemente u operativamente entre sí únicamente a través de la propia partícula (por ejemplo, nanopartícula, liposoma), y no se unen covalentemente entre sí de ningún otro modo; es decir, están unidos individualmente a la misma partícula. En otras realizaciones, el polipéptido p97 y el anticuerpo se conjugan en primer lugar covalentemente entre sí, como se describe en el presente documento (por ejemplo, a través de una molécula de enlazador), y después se unen a o se encapsulan en una partícula (por ejemplo, inmunoliposoma, nanopartícula). En realizaciones específicas, la partícula es un liposoma, y la composición comprende uno o más polipéptidos p97, uno o más antígenos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y una mezcla de lípidos para formar un liposoma (por ejemplo, fosfolípidos, cadenas lipídicas mixtas con propiedades surfactantes). En algunos aspectos, el polipéptido p97 y el anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno) están mezclados individualmente con la mezcla del lípido/liposoma, de tal forma que la formación de estructuras de liposoma une operativamente el polipéptido p97 y el anticuerpo sin la necesidad de una conjugación covalente. En otros aspectos, el polipéptido p97 y el anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno) se

- conjugan covalentemente en primer lugar entre sí, como se describe en el presente documento, y después se mezclan con lípidos para formar un liposoma. El polipéptido p97, el anticuerpo, o el conjugado de p97 anticuerpo pueden retenerse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980). La partícula o partículas o liposomas pueden comprender adicionalmente otros agentes citotóxicos.
- 10 La dosificación y duración precisa de tratamiento va en función de la enfermedad a tratar y puede determinarse empíricamente usando protocolos de ensayo conocidos o ensayando las composiciones en sistemas modelo conocidos en la técnica y extrapolando las mismas. También pueden realizarse ensayos clínicos controlados. Las dosificaciones también pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Una composición farmacéutica se formula generalmente y se administra para ejercer un efecto terapéuticamente útil minimizando al mismo tiempo efectos secundarios no deseados. La composición puede administrarse una vez, o puede dividirse en varias dosis más pequeñas a administrar en intervalos de tiempo. Para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos pueden ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual.

Las composiciones que contienen conjugado pueden administrarse en solitario o en combinación con otros tratamientos de cáncer conocidos, tales como terapia de radiación, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con antibióticos.

Las rutas típicas de administración de estas composiciones farmacéuticas y relacionadas incluyen, por lo tanto, sin limitación, oral, tópica, transdérmica, inhalación, parenteral, sublingual, bucal, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención se formulan para permitir que los principios activos contenidos en la presente estén biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un sujeto o paciente pueden adoptar la forma de una o más unidades de dosificación, donde, por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación individual, y un recipiente de un conjugado descrito en el presente documento en forma de aerosol puede comprender una pluralidad de unidades de dosificación. Se conocen métodos actuales para preparar dichas formas de dosificación, o serán evidentes para los expertos en la técnica; por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición a administrar contendrá, en cualquier caso, una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de la presente divulgación, para el tratamiento de una enfermedad o afección de interés de acuerdo con las enseñanzas del presente documento.

Una composición farmacéutica puede estar en forma de un sólido o líquido. En una realización, el vehículo o vehículos son particulados, de manera que las composiciones estén, por ejemplo, en forma de comprimido o polvo. El vehículo o vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un aceite oral, líquido inyectable o un aerosol, que sea útil, por ejemplo, en administración por inhalación. Cuando está destinada a administración oral, la composición farmacéutica está preferiblemente en forma sólida o líquida, donde las formas semi-sólidas, semi-líquidas, en suspensión y en gel se incluyen en las formas consideradas en el presente documento como sólidas o líquidas.

Como una composición sólida para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en un polvo, gránulo, comprimido, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o similar. Tal composición sólida contendrá típicamente uno o más diluyentes inertes o vehículos comestibles. Además, puede estar presente uno o más de los siguientes: aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; excipientes, tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes, tales como ácido algínico, alginato sódico, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes, tales como estearato de magnesio o Sterotex; emolientes, tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; un agente saporífero, tal como hierbabuena, salicilato de metilo o saporífero de naranja; y un agente colorante. Cuando la composición farmacéutica está en forma de cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tales como polietilenglicol o aceite.

La composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración oral o para administración por inyección, como dos ejemplos.

Cuando está destinada a administración oral, la composición preferida contiene, además de los presentes compuestos, uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y un potenciador del sabor. En una composición destinada a administrarse por inyección, puede incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.

5

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles, tal como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro sódico isotónico, aceites fijos, tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como el disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminatetracético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral puede contenerse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

Una composición farmacéutica líquida destinada a administración parenteral u oral debe contener una cantidad de un conjugado como se desvela en el presente documento, de tal forma que se obtendrá una dosificación adecuada. Típicamente, esta cantidad es al menos el 0,01 % del anticuerpo en la composición. Cuando está destinada a la administración oral, esta cantidad puede variarse para que sea entre el 0,1 y aproximadamente el 70 % del peso de la composición. Algunas composiciones farmacéuticas orales contienen entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 75 % del anticuerpo. En ciertas realizaciones, las composiciones y preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se preparan de manera que una unidad de dosificación parenteral contenga entre el 0,01 al 10 % en peso del anticuerpo antes de la dilución.

20

La composición farmacéutica puede estar destinada a una administración tópica, en cuyo caso, el vehículo puede comprender adecuadamente una solución emulsión, pomada o base en gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionante y estabilizantes. Pueden estar presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica para administración tópica. Si está destinada a una administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o dispositivo de iontoforesis. La composición farmacéutica puede estar destinada a administración rectal, en forma de, por ejemplo, un supositorio, que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginosa como un excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.

25

La composición farmacéutica puede incluir diversos materiales, que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman un revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman el revestimiento son típicamente inertes, y pueden seleccionarse entre, por ejemplo, azúcar, laca, y otros agentes de revestimiento entéricos. Como alternativa, los principios activos pueden encerrarse en una cápsula de gelatina. La composición farmacéutica en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se une al anticuerpo de la invención y facilita de esta manera la administración del compuesto. Los agentes adecuados que pueden actuar en esta capacidad incluyen otros anticuerpos monoclonales o policlonales, una o más proteínas o un liposoma. La composición farmacéutica puede consistir básicamente en unidades de dosificación que pueden administrarse en forma de un aerosol. El término aerosol se usa para representar una diversidad de sistemas que varían de los de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en envases a presión. La administración puede ser por un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba adecuado que dispensa los principios activos. Los aerosoles pueden administrarse en sistemas monofásicos, bifásicos o trifásicos con el fin de administrar los principios activos. La administración del aerosol incluye el recipiente, activadores, válvulas, sub-recipientes, y similares, necesarios que pueden formar juntos un kit. Un experto en la técnica, sin demasiada experimentación, puede determinar los aerosoles preferidos.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse por metodología ya conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica destinada a administrarse por inyección puede prepararse combinando una composición que comprende un conjugado como se describe en el presente documento y opcionalmente, uno o más de sales, tampones y/o estabilizantes, con agua estéril destilada para formar una solución. Puede añadirse un tensioactivo para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son compuestos que interactúan no covalentemente con la composición de anticuerpo para facilitar la disolución o suspensión homogénea del anticuerpo en el sistema de administración acuoso.

30

Las composiciones pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico (por ejemplo, el conjugado) empleado; la estabilidad metabólica y duración de acción del compuesto; la edad, peso corporal, salud general, sexo, y dieta del paciente; el modo y tiempo de administración; la tasa de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o afección particular; y el sujeto que se somete a la terapia. Generalmente, una dosis diaria terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 0,001 mg/kg (es decir, 0,07 mg) a aproximadamente 100 mg/kg (es decir, 7,0 g); preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 0,01 mg/kg (es decir, 0,7 mg) a aproximadamente 50 mg/kg (es decir, 3,5 g); más preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 1 mg/kg (es decir, 70 mg) a aproximadamente 25 mg/kg (es decir, 1,75 g).

Las composiciones que comprenden los conjugados de la presente divulgación también pueden administrarse simultáneamente con, antes de, o después de la administración de uno o más agentes terapéuticos diferentes. Dicha terapia de combinación puede incluir la administración de una única formulación de dosificación farmacéutica que contiene un compuesto de la invención y uno o más agentes activos adicionales, así como la administración de composiciones que comprenden conjugados de la invención y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica separada. Por ejemplo, un conjugado, como se describe en el presente documento, y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una única composiciones de dosificación oral, tal como un comprimido o cápsula, o cada agente puede administrarse en formulaciones de dosificación oral separadas. De forma similar, un conjugado, como se describe en el presente documento, y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una única composición de dosificación parenteral, tal como en una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable, o cada agente puede administrarse en formulaciones de dosificación parenteral separadas. Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, las composiciones que comprenden conjugados y uno o más agentes activos adicionales, pueden administrarse básicamente al mismo tiempo, es decir, a la vez, o en momentos graduales por separado, es decir, secuencialmente y en cualquier orden; se entiende que la terapia de combinación incluye todos estos regímenes.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, también se contempla la administración de composiciones de conjugado de esta divulgación en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes. Dichos agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para una patología particular como se describe en el presente documento, tal como artritis reumatoide, inflamación o cáncer. Los agentes terapéuticos ejemplares contemplados incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, AINEs, DMARD, antiinflamatorios, quimioterapéuticos, radioterapéuticos, u otros agentes activos y auxiliares.

En ciertas realizaciones, los conjugados desvelados en el presente documento pueden administrarse junto con cualquier número de agentes quimioterapéuticos o citotóxicos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos o citotóxicos incluyen agentes de alquilación, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXANTM); sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuoona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; una fuente de ácido fólico, tal como ácido frofínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrito de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK.RTM.; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2, 2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb

Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE[®], Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 5 2000; difluorometilmitina (DMFO); derivados de ácido retinoico, tales como Targretin[™] (bexaroteno), Panretin[™] (alitretinoína); ONTAK[™] (denileucina difitox); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores, tales como anti-estrógenos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromataasa, 4-hidroxitamoxifeno, 10 trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Pueden usarse una diversidad de agentes terapéuticos diferentes junto con los conjugados descritos en el presente 15 documento. En una realización, el conjugado se administra con un agente antiinflamatorio. Los agentes o fármacos antiinflamatorios incluyen, pero sin limitación, esteroides y glucocorticoides (incluyendo betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incluyendo aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato.

20 Las composiciones pueden administrarse a un individuo que padece una enfermedad como se describe en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, enfermedades neoplásicas, enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas, infecciones, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, y enfermedades asociadas a una angiogénesis anormal. Las enfermedades 25 particulares incluyen trastornos que expresan Her2/neu, tales como cánceres que expresan Her2/neu.

Ciertas divulgaciones incluyen métodos de tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto un conjugado de p97-anticuerpo descrito en el presente documento, o una composición que comprende un 30 conjugado de p97-anticuerpo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. "Cáncer" se refiere generalmente a una clase de enfermedades o afecciones en las que un grupo de células muestran uno o más de crecimiento descontrolado (es decir, división más allá de los límites normales), invasión (es decir, intrusión en y destrucción de tejidos adyacentes), y/o metástasis (es decir, propagación a otras ubicaciones en el cuerpo a través de la linfa o la sangre). Estas propiedades malignas de los cánceres los diferencian de los cánceres benignos, que están auto-limitados, y típicamente no invadirán ni metastatizarán.

35 Una "célula cancerosa" o "célula tumoral" se refiere a una célula individual de un crecimiento o tejido canceroso. Un tumor se refiere generalmente a una tumefacción o lesión formada por un crecimiento anormal de células, que pueden ser benignas, pre-malignas o malignas. La mayoría de los cánceres forman tumores sólidos, pero algunos, por ejemplo la leucemia, no forman necesariamente tumores. Para estos cánceres que forman tumores, los términos 40 (célula) cancerosa y (célula) tumoral se usan de forma intercambiable. Los ejemplos generales incluyen cánceres primarios y metastásicos. Los ejemplos particulares de cánceres primarios y metastásicos incluyen, sin limitación, cánceres de próstata, cánceres de mama, cánceres gastrointestinales (por ejemplo, cánceres de colon, carcinoma colorrectal, cánceres rectales), cánceres de pulmón (por ejemplo, cánceres de pulmón de células pequeñas, carcinomas de pulmón de células no pequeñas), cánceres de ovario, cánceres testiculares, cánceres de cabeza y 45 cuello, cánceres de estómago, cánceres de vejiga (por ejemplo, carcinomas de vejiga urinarios), cánceres pancreáticos, cánceres de hígado, cánceres de riñón (por ejemplo, carcinomas de células renales), carcinomas de células escamosas, cánceres del SNC y de cerebro primarios y metastásicos (por ejemplo, neuroblastomas, glioblastomas), melanomas tales como melanomas malignos, cánceres de piel no melanoma, cánceres de tiroides (por ejemplo, cánceres tiroideos medulares (MTC)), cánceres endometriales, tumores epiteliales, cánceres óseos, y 50 cánceres hematopoyéticos, tales como linfomas (por ejemplo, linfomas de linfocitos T, tales como linfoma de linfocitos T cutáneo (CTCL), linfomas de linfocitos B, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células de manto, linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma folicular), leucemias (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de las células pilosas, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielocítica, leucemia mieloide o mielógena aguda), mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, y linfoma no Hodgkin. Por lo tanto, en ciertas 55 realizaciones, un sujeto tiene uno o más de los cánceres que se han descrito anteriormente.

Ciertas realizaciones se refieren a métodos para tratar un cáncer del sistema nervioso central (SNC), opcionalmente el cerebro. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer primario del SNC, tal como un cáncer primario del cerebro. Por ejemplo, los métodos puede ser para tratar un glioma, meningioma, adenoma en la pituitaria,

neurinoma del acústico, linfoma primario del SNC, o un tumor neuroectodérmico primitivo (meduloblastoma). En algunas realizaciones, el glioma es un astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma o un papiloma del plexo coroideo. En ciertas realizaciones, el carcinoma primario del SNC o cerebral es glioblastoma multiforme, tal como un glioblastoma de células gigantes o un gliosarcoma.

5

En realizaciones particulares, el cáncer es un cáncer metastásico del SNC, por ejemplo, un cáncer que ha metastatizado al cerebro. Los ejemplos de dichos cánceres incluyen, sin limitación, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres del tracto genitourinario, cánceres del tracto gastrointestinal (por ejemplo, cánceres colorrectales, carcinomas pancreáticos), osteosarcomas, melanomas, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de próstata (por ejemplo, adenocarcinomas prostáticos), y cánceres hematopoyéticos, tales como linfomas. Ciertas realizaciones incluyen, por lo tanto, métodos para tratar, inhibir o prevenir la metástasis de un cáncer administrando a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de p97-anticuerpo descrito en el presente documento (por ejemplo, en una cantidad que, tras la administración, inhiba, prevenga o retrase la metástasis de un cáncer resistente a anticuerpos de una manera estadísticamente significativa, es decir, con respecto a un control apropiado como se conocerá por los expertos en la técnica). En realizaciones particulares, el sujeto tiene un cáncer que todavía no ha metastatizado al sistema nervioso central, incluyendo uno o más de los cánceres que se han descrito anteriormente, entre otros conocidos en la técnica.

En algunas divulgaciones, el cáncer o célula cancerosa se asocia a la expresión de al menos uno de Her2/neu, receptor Her1/EGF, Her3, antígeno A33, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23 (receptor de IgE), antígeno C242, 5T4, IL-6, IL-13, factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (por ejemplo, VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, tenascina, vimentina, receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R), alfa-fetoproteína, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), integrina $\alpha_v\beta_3$, integrina $\alpha_5\beta_1$, receptor de folato 1, glucoproteína transmembrana NMB, proteína de activación de fibroblastos, alfa (FAP), glucoproteína 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (o CA-125), fosfatidilserina, antígeno de membrana prostático específico (PMSA), antígeno NR-LU-13, TRAIL-R1, miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 10b (TNFRSF10B o TRAIL-R2), miembro de la familia SLAM 7 (SLAMF7), antígeno EGP40 de pancarcinoma, factor de activación de linfocitos B (BAFF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, glucoproteína EpCAM (17-1A), muerte programada 1, proteína disulfuro isomerasa (PDI), fosfatasa de regeneración hepática 3 (PRL-3), fosfatasa ácida prostática, antígeno Lewis-Y, GD2 (un disialogangliósido expresado en tumores de origen neuroectodérmico), glipicano 3 (GPC3), o mesotelina. En aspectos específicos, la porción de anticuerpo monoclonal del conjugado de p97-anticuerpo se une específicamente a uno o más de los antígenos asociado a un cáncer anteriores, o antígenos de cáncer.

35

Los aspectos particulares se refieren al tratamiento de cánceres asociados a la expresión de Her2/neu. Por ejemplo, una realización de la invención proporciona un método para tratar, inhibir o prevenir un cáncer, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de mama que expresa Her2/neu y cáncer de mama metastásico, administrando a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado desvelado en el presente documento. Se considera eficaz una cantidad que, tras la administración, inhiba, prevenga o retrase el avance y/o metástasis de un cáncer de una manera estadísticamente significativa (es decir, con respecto a un control apropiado como se conocerá por los expertos en la técnica).

Otra divulgación proporciona un método para tratar, inhibir o prevenir una metástasis de un cáncer de mama que expresa Her2/neu administrando a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado desvelado en el presente documento (por ejemplo, en una cantidad que, tras la administración, inhiba, prevenga o retrase la metástasis de un cáncer de una manera estadísticamente significativa, es decir, con respecto a un control apropiado como se conocerá por los expertos en la técnica).

Las divulgaciones particulares incluyen el uso de p97-trastuzumab para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína Her2 y han recibido uno o más regímenes de quimioterapia para su enfermedad metastásica. Algunos aspectos incluyen p97-trastuzumab en combinación con paclitaxel para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína Her2 y que no han recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica.

55

Las divulgaciones específicas se refieren al tratamiento de cánceres asociados a la expresión de Her1/EGFR. Por ejemplo, ciertos aspectos incluyen el tratamiento de un cáncer colorrectal metastásico o un cáncer de cabeza y cuello, donde el conjugado de p97-anticuerpo se une específicamente a Her1/EGFR y es un antagonista de EGFR. En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer colorrectal metastásico que expresa EGFR, y es opcionalmente KRAS

- de tipo silvestre. En aspectos particulares, el conjugado de p97-anticuerpo se administra a un sujeto con cáncer colorrectal metastásico que expresa EGFR después del fracaso de regímenes basados tanto en irinotecán como en oxiplatino. En algunos aspectos, el sujeto con cáncer colorrectal metastásico no tolera los regímenes basados en irinotecán o es resistente a la quimioterapia basada en irinotecán. En otros aspectos, el cáncer es un carcinoma de células escamosas local o regionalmente avanzado de la cabeza y el cuello, un carcinoma de células escamosas de enfermedad locorregional recurrente o metastásico de la cabeza y el cuello, o un carcinoma de células escamosas recurrente o metastásico de la cabeza y el cuello que progresa después de una terapia basada en platino. En algunas de estas realizaciones y relacionadas, la porción de anticuerpo del conjugado de p97-anticuerpo es cetuximab, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 10 El conjugado de p97-anticuerpo comprende un anticuerpo que se une específicamente a Her-2/neu humano, tal como trastuzumab, y el sujeto tiene opcionalmente cáncer de mama o cáncer de mama metastásico, o un cáncer (metastásico) del SNC, como se describe.
- 15 Como se ha indicado anteriormente, el uso de conjugados de p97-anticuerpo para tratar cánceres puede combinarse con otras modalidades terapéuticas. Por ejemplo, una composición que comprende un conjugado de p97-anticuerpo puede administrarse a un sujeto antes, durante o después de otras intervenciones terapéuticas, incluyendo cuidado sintomático, radioterapia, cirugía, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, quimioterapia, terapia antibiótica, o cualquiera combinación de los mismos. El cuidado sintomático incluye la administración de corticosteroides, para reducir el cerebral, cefaleas, disfunción cognitiva, y emesis, y la administración de anti-convulsivos, para reducir las convulsiones. La radioterapia incluye irradiación del cerebro completo, radioterapia fraccionada, y radiocirugía, tal como radiocirugía estereotáctica, que puede combinarse adicionalmente con cirugía tradicional.
- 20 En terapias de combinación específicas, la porción de anticuerpo del conjugado de p97-anticuerpo comprende cetuximab, y el conjugado de p97-cetuximab se usa para tratar un sujeto con carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello local o regionalmente avanzado en combinación con terapia de radiación. En otros aspectos, el conjugado de p97-cetuximab se usa para tratar un sujeto con carcinoma de células escamosas de enfermedad locorregional recurrente o metastásico de la cabeza y el cuello en combinación con terapia a base de platino con 5-fluorouracilo (5-FU). En algunos casos, el conjugado de p97-cetuximab se une covalentemente al agente basado en platino, tal como 5-fluorouracilo. En algunos aspectos, el conjugado de p97-cetuximab se usa en combinación con irinotecán para tratar un sujeto con cáncer colorrectal que expresa y que es resistente a la quimioterapia basada en irinotecán. En casos particulares, el conjugado de p97-cetuximab se une covalentemente a irinotecán.
- 25 Se conocen en la técnica métodos para identificar sujetos con una o más de las enfermedades o afecciones descritas en el presente documento.

Para el uso *in vivo* para el tratamiento de una enfermedad humana, los conjugados descritos en el presente documento se incorporan generalmente en una composición farmacéutica antes de la administración. Una composición farmacéutica comprende uno o más de los conjugados descritos en el presente documento en combinación con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable como se describe en otra parte en el presente documento. Para preparar una composición farmacéutica, una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos, se mezcla con cualquier vehículo o vehículos o excipiente farmacéuticos conocidos por los expertos en la técnica como adecuados para el modo de administración particular. Un vehículo farmacéutico puede ser líquido, semi-líquido o sólido. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir, por ejemplo, un diluyente estéril (tal como agua), una solución salina, aceite fijo, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otro disolvente sintético; agentes antimicrobianos (tales como alcohol bencilico y metilparabenos); antioxidantes (tales como ácido ascórbico y bisulfito sódico) y agentes quelantes (tal como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA)); tampones (tales como acetatos, citratos y fosfatos). Si se administran por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezcla de los mismos.

Las composiciones que comprenden conjugados como se describe en el presente documento, pueden prepararse con vehículos que protegen a los conjugados contra una eliminación rápida del cuerpo, tal como formulaciones o revestimientos de liberación prolongada. Dichos vehículos incluyen formulaciones de liberación controlada, tales como, pero sin limitación, implantes y sistemas de administración microencapsulados, y polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como vinil acetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, poliortoésteres, ácido poliláctico y otros conocidos por los expertos en la técnica.

Los siguientes Ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

5

EJEMPLO 1

CONJUGACIÓN DE P97 CON ANTICUERPOS ANTI-HER2/NEU

10 Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado específico para la proteína Her2/neu y usado clínicamente en el tratamiento de cáncer de mama HER2+, se unió químicamente a un vector de administración p97 (Transcend; BiOasis), como se describe a continuación.

Preparación inicial del anticuerpo

15

1. Se disolvieron aproximadamente 100 mg (peso formulado incluyendo excipientes, etc.) de anticuerpo "BTA" (Roche), que se une específicamente a la proteína Her2/neu humana, en 1,5 ml de agua desionizada y se intercambia con tampón en un tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7,5 en una columna PD10 individual (GE 170851-01), produciendo 3,0 ml de una solución de anticuerpo en 18,10 mg/ml como se indica por espectrofotometría UV-visible a 280 nm, y asumiendo una absorbancia de 1,40 a esta longitud de onda para una solución de anticuerpo de 1 mg/ml (*Anticuerpo A*).

20

2. Se disolvieron aproximadamente 100 mg (peso formulado incluyendo excipientes, etc.) de anticuerpo "BTA" (Roche) en 4,0 ml de agua desionizada y se intercambió con tampón en un tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7,5 en tres columnas PD10 (GE 170851-01), produciendo 8,1 ml de una solución de anticuerpo en 6,50 mg/ml como se indica por espectrofotometría UV-visible a 280 nm, y asumiendo una absorbancia de 1,40 a esta longitud de onda para una solución de anticuerpo de 1 mg/ml (*Anticuerpo B*).

25

Marcado con Cy5.5 del anticuerpo

30

3. A 53,4 mg (2.95 ml) del Anticuerpo B se le añadieron 1,89 mg (189 ul) de una solución de 10,0 mg/ml de Cy5.5 NHS éster (Lumiprobe 24020) en DMSO, equivalente a un exceso 7:1 de Cy5.5:anticuerpo.

4. La reacción del anticuerpo con el colorante se dejó continuar durante 60 minutos a 20 °C.

5. El conjugado anticuerpo-colorante en bruto se purificó usando cromatografía de exclusión por tamaño en dos columnas PD10, usando fosfato potásico 0,1 M a pH 7,5 como eluyente, para eliminar los subproductos de bajo peso molecular. Esto produjo una solución de anticuerpo marcado con colorante con una concentración de anticuerpo de 9,45 mg/ml y con una incorporación aparente de 2,01 moléculas de colorante por molécula de anticuerpo como se indica por espectrofotometría UV-visible a 280 nm y 673 nm, y asumiendo una absorbancia de 1,40 a esta longitud de onda para una solución de anticuerpo de 1 mg/ml y un coeficiente de extinción molar de $133.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 673 nm para Cy5.5 (*Anticuerpo Marcado con colorante B*).

35

40

Incorporación de maleimidias en anticuerpo no marcado

45

6. A 40 mg (6,15 ml) del Anticuerpo A se le añadieron 0,31 mg (62 ul) de una solución de 5,0 mg/ml de 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Thermo 22360) en DMSO, equivalente a un exceso de SMCC:anticuerpo de 3,5:1.

7. La reacción de activación del anticuerpo se dejó continuar durante 60 minutos a 20 °C.

8. El anticuerpo no marcado activo con maleimida en bruto se purificó usando cromatografía de exclusión por tamaño en cuatro columnas PD10 para eliminar los subproductos de bajo peso molecular, usando fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 150 mM, tampón EDTA 5 mM a pH 7,0 como eluyente. Esto produjo una solución de anticuerpo no marcado activado por maleimida con una concentración de anticuerpo de 3,34 mg/ml, asumiendo una absorbancia de 1,40 a esta longitud de onda para una solución de anticuerpo de 1 mg/ml. (*Anticuerpo no Marcado Activado con Maleimida A1*)

50

55

9. A 5 mg (769 ul) del Anticuerpo A se le añadieron 0,17 mg (33 ul) de una solución de 5,0 mg/ml de 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Thermo 22360) en DMSO, equivalente a un exceso de SMCC:anticuerpo de 15:1.

10. La reacción de activación del anticuerpo se dejó continuar durante 60 minutos a 20 °C.

11. El anticuerpo no marcado activado por maleimida en bruto se purificó usando cromatografía de exclusión por tamaño en una columna PD10 individual para eliminar los subproductos de bajo peso

molecular, usando fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 150 mM, tampón EDTA 5 mM a pH 7,0 como eluyente. Esto produjo una solución de anticuerpo no marcado activado por maleimida con una concentración de anticuerpo de 2,36 mg/ml, asumiendo una absorbancia de 1,40 a esta longitud de onda para una solución de anticuerpo de 1 mg/ml. (*Anticuerpo no Marcado Activado con Maleimida A2*)

5

Incorporación de maleimidias en el anticuerpo marcado con Cy5.5

12. A 40 mg (4,23 ml) del Anticuerpo Marcado con colorante B se le añadieron 0,45 mg (89 ul) de una solución de 5,0 mg/ml de 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Thermo 22360) en DMSO, equivalente a un exceso de SMCC:anticuerpo de 5:1.

10

13. La reacción de activación del anticuerpo se dejó continuar durante 60 minutos a 20 °C.

14. El anticuerpo marcado con colorante activado por maleimida en bruto se purificó usando cromatografía de exclusión por tamaño en tres columnas PD10 para eliminar los subproductos de bajo peso molecular, usando fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 150 mM, tampón EDTA 5 mM a pH 7,0 como eluyente. Esto produjo una solución de anticuerpo marcado con colorante activado por maleimida con una concentración de anticuerpo de 4,46 mg/ml y con una incorporación aparente de 1,05 moléculas de colorante por molécula de anticuerpo como se indica por espectrofotometría UV-visible a 280 nm y 673 nm, y asumiendo una absorbancia de 1,40 a esta longitud de onda para una solución de anticuerpo de 1 mg/ml y un coeficiente de extinción molar de $133.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 673 nm para Cy5.5. (*Anticuerpo Marcado con Colorante Activado con Maleimida B1*)

20

15. A 5 mg (529 ul) del Anticuerpo Marcado con colorante B se le añadieron 0,20 mg (40 ul) de una solución de 5,0 mg/ml de 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Thermo 22360) en DMSO, equivalente a un exceso 18:1 de SMCC:anticuerpo.

16. La reacción de activación del anticuerpo se dejó continuar durante 60 minutos a 20 °C.

25

17. El anticuerpo marcado con colorante activado por maleimida en bruto se purificó usando cromatografía de exclusión por tamaño en una columna PD10 individual para eliminar los subproductos de bajo peso molecular, usando fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 150 mM, tampón EDTA 5 mM a pH 7,0 como eluyente. Esto produjo una solución de anticuerpo marcado con colorante activado por maleimida con una concentración de anticuerpo de 1,85 mg/ml y con una incorporación aparente de 0,66 moléculas de colorante por molécula de anticuerpo como se indica por espectrofotometría UV-visible a 280 nm y 673 nm, y asumiendo una absorbancia de 1,40 a esta longitud de onda para una solución de anticuerpo de 1 mg/ml y un coeficiente de extinción molar de $133.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 673 nm para Cy5.5. (*Anticuerpo Marcado con Colorante Activado con Maleimida B2*)

30

35 Preparación inicial de p97

18. En paralelo con las etapas 1-17, se intercambiaron en tampón aproximadamente 70 mg de p97 (BiOasis) en tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7,5 en tres columnas PD10, produciendo 11,2 ml de una solución de p97 en 6,37 mg/ml como se indica por espectrofotometría UV-visible a 280 nm, y asumiendo una absorbancia de 1,19 a esta longitud de onda para una solución de 1 mg/ml de p97.

40

Tiolación de p97

19. A 54 mg (8,48 ml) del p97 intercambiado con tampón se le añadieron 0,41 mg (82 ul) de una solución de 5,0 mg/ml de ácido S-acetiltioacético, succinimidil éster (SATA, Thermo 26102) en DMSO, equivalente a una relación SATA: p97 de 3,2:1.

45

20. La reacción de S-acetiltiolación se dejó avanzar durante 55 minutos a 20 °C.

21. Se añadieron 848 ul de una solución acuosa de sal disódica EDTA 0,05 M y clorhidrato de hidroxilamina 2,5 M, pH 7,0, para desproteger los tioles, dejando avanzar la reacción de desprotección durante 17 minutos a 20 °C.

50

22. El p97 tiolado en bruto se purificó usando cromatografía de exclusión por tamaño en cinco columnas PD10 para eliminar los subproductos de bajo peso molecular, usando fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 150 mM, tampón EDTA 5 mM a pH 7,0 como eluyente. Esto produjo una solución de p97 tiolado con una concentración de p97 de 3,65 mg/ml como se indica por espectrofotometría UV-visible a 280 nm, y asumiendo una absorbancia de 1,19 a esta longitud de onda para una solución de 1 mg/ml de p97. Una muestra se analizó para comprobar el contenido de tiol usando reactivo de Ellman, indicando una incorporación de 0,9 grupos tiol por molécula p97. (*p97 tiolado C1*)

55

23. A 8 mg (1,26 ml) del p97 intercambiado con tampón se le añadieron 0,29 mg (57 ul) de una solución de 5,0 mg/ml de ácido S-acetiltioacético, succinimidil éster (SATA, Thermo 26102) en DMSO, equivalente a

una relación SATA:p97 de 15:1.

24. La reacción de S-acetililación se dejó avanzar durante 55 minutos a 20 °C.

25. Se añadieron 126 µl de una solución acuosa de sal disódica EDTA 0,05 M y clorhidrato de hidroxilamina 2,5 M, pH 7,0, para desproteger los tioles, dejando avanzar la reacción de desprotección durante 17 minutos a 20 °C.

26. El p97 tiolado en bruto se purificó usando cromatografía de exclusión por tamaño en una columna PD10 individual para eliminar los subproductos de bajo peso molecular, usando fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 150 mM, tampón EDTA 5 mM a pH 7,0 como eluyente. Esto produjo una solución de p97 tiolado con una concentración del p97 de 2,83 mg/ml como se indica por espectrofotometría UV-visible a 280 nm, y asumiendo una absorbancia de 1,19 a esta longitud de onda para una solución de 1 mg/ml de p97. Se ensayó una muestra para comprobar el contenido de tiol usando reactivo de Ellman, indicando una incorporación de 3,8 grupos tiol por molécula p97. (p97 tiolado C2)

Conjugaciones de p97-anticuerpo

27. (BOA2/1) 5,0 mg (1,50 ml) de *Anticuerpo no Marcado Activado con Maleimida A1* y 12,93 mg (3,55 ml) de *p97 tiolado C1*, equivalente a una relación p97:anticuerpo de 4,0:1, se dejaron reaccionar juntos durante 18 horas a 20 °C.

28. (BOA2/2) 5,0 mg (1,12 ml) de *Anticuerpo Marcado con Colorante Activado con Maleimida B1* y 12,93 mg (3,55 ml) de *p97 tiolado C1*, equivalente a una relación p97:anticuerpo de 4,0:1, se dejaron reaccionar juntos durante 18 horas a 20 °C.

29. (BOA2/3) 2,5 mg (1,06 ml) de *Anticuerpo no Marcado Activado con Maleimida A2* y 12,93 mg (3,55 ml) de *p97 tiolado C1*, equivalente a una relación p97:anticuerpo de 8,0:1, se dejaron reaccionar juntos durante 18 horas a 20 °C.

30. (BOA2/4) 2,5 mg (1,35 ml) de *Anticuerpo Marcado con Colorante Activado con Maleimida B2* y 12,93 mg (3,55 ml) de *p97 tiolado C1*, equivalente a una relación p97:anticuerpo de 8,0:1, se dejaron reaccionar juntos durante 18 horas a 20 °C.

31. (BOA2/5) 23,0 mg (6,89 ml) de *Anticuerpo no Marcado Activado con Maleimida A1* y 2,47 mg (0,87 ml) de *p97 tiolado C2*, equivalente a una relación p97:anticuerpo de 1:6,0, se dejaron reaccionar juntos durante 18 horas a 20 °C.

32. (BOA2/6) 23,0 mg (5,16 ml) de *Anticuerpo Marcado con Colorante Activado con Maleimida B1* y 2,47 mg (0,87 ml) de *p97 tiolado C2*, equivalente a una relación p97:anticuerpo de 1:6,0, se dejaron reaccionar juntos durante 18 horas a 20 °C.

33. Los seis conjugados de anticuerpo-p97 y anticuerpo-Cy5.5-p97 en bruto de las etapas 27-32 se concentraron a 1-1,5 ml usando filtros de centrifugadora Vivaspin 6 (corte de 30 kDa) y se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento, usando una columna 1,6 x 36 cm Superdex 200PG a 2,0 ml/min con tampón fosfato potásico 50 mM + cloruro sódico 150 mM, pH 6,7, como eluyente.

34. Esto produjo conjugados con las relaciones p97:anticuerpo aproximadas que se muestran a continuación, como se indica por los datos de cromatografía espectrofotométrica UV y de exclusión por tamaño.

Tabla 2

Conjugado	Relación P97:anticuerpo
(BOA2/1)	13:1
(BOA2/2)	1,5:1
(BOA2/3)	3:1
(BOA2/4)	3:1
(BOA2/5)	1:2,5
(BOA2/6)	1:2,5

EJEMPLO 2

LOS CONJUGADOS DE P97-ANTICUERPO HER2/NEU MEJORAN LA MUERTE CELULAR DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Este ejemplo demuestra que los conjugados de p97-anticuerpo Her2/neu de la invención han mejorado la actividad contra las células de cáncer de mama en comparación con los anticuerpos anti-Her2/neu que no están conjugados con p97.

Los compuestos indicados a continuación se ensayaron contra las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7

vector, MCF-7/Her2, BT474 y SKBr3, como se describe adicionalmente a continuación. El vehículo fue PBS, pH 6,7.

Tabla 3

Compuesto N°	Peso Molecular (g/mol)
Trastuzumab	145.531,50
BOA2/1	250.000,00
BOA2/3	760.000,00
BOA2/5	530.000,00
hMTF (p97)	76.000,00

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

La línea celular MCF-7 vector (cáncer de mama humano) se mantuvo en las siguientes condiciones: medio RPMI 1640, L-glutamina 2 mM, FBS al 10 %, 500 µg/ml de G418. La línea celular MCF-7 HER2 (cáncer de mama humano, transfectada) se mantuvo en las siguientes condiciones: medio RPMI 1640, L-glutamina 2 mM, FBS al 10 %, 500 µg/ml de G418. La línea celular SKBR3 (cáncer de mama humano) se mantuvo en las siguientes condiciones: Medio McCoys 5A, L-glutamina 1,5 mM, FBS al 10 %. La línea celular BT474 (cáncer de mama humano) se mantuvo en las siguientes condiciones: medio DMEM, L-glutamina 2 mM, FBS al 10 %.

Optimización del crecimiento celular

Se realiza un estudio de optimización del crecimiento celular antes del estudio de cribado del fármaco. El objetivo del estudio de crecimiento celular es determinar la densidad de siembra óptica para cada línea celular para asegurar que se alcanza una confluencia del 95-100 % después de 96 horas de incubación (tanto en condiciones séricas altas como bajas) y determinar las condiciones de tinción óptimas para Hoechst 33342 (H33342). Se ensayan las siguientes densidades celulares: 500, 1000, 1500, 2000 2500 y 3000 células/pocillo en 50 µl en condiciones de suero normal (Tabla 4) y 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 y 12000 células/pocillo en 50 µl en condiciones séricas bajas (1 %) (Tabla 5). Las células se diluyen a una concentración diferente en un bloque profundo de 96 pocillos de 2 ml en base a las siguientes tablas:

Tabla 4. Condiciones de suero normal

Número de células (50 µl)	Volumen del medio de cultivo celular para dilución (ml)	Volumen de solución celular de reserva (ml) (reserva = 60.000 células/ml)	Concentración celular final (células/ml)
3.000	0,000	2,000	60000
2.500	0,333	1,667	50000
2.000	0,667	1,333	40000
1.500	1,000	1,000	30000
1.000	1,333	0,667	20000
500	1,667	0,333	10000

Tabla 5. Concentraciones séricas bajas

Número de células (50 µl)	Volumen del medio de cultivo celular para dilución (ml)	Volumen de solución celular de reserva (ml) (*reserva = 240.000 células/ml)	Concentración celular final (células/ml)
12.000	0,000	2,000	240.000
10.000	0,333	1,667	200.000
8.000	0,667	1,333	160.000
6000	1,000	1,000	120.000
4.000	1,333	0,667	80.000
2.000	1,667	0,333	40.000

*Tomar una solución de reserva de 60.000/25 ml de células, centrifugar y añadir 6,5 ml de medio

Se realiza la colocación en placas con el Hydra transfiriendo del bloque profundo de 96 pocillos a pocillos de 4 cuadrantes en Grenier Bio correspondiente o con una pipeta multi-canal. A cada pocillo de la placa de 384 pocillos se le añaden 50 µl y esto se repite. Después de 24 horas, el medio se aspira y se reemplaza con medio que contiene

siero normal o sin suero. Durante la etapa de aspiración, se eliminan aproximadamente 45 µl de medio y se reemplazan con medio nuevo. La tinción se realiza a diario en 1 placa que se procesará por imagen. Las imágenes se comparan durante el transcurso de tiempo para cada línea celular, con el fin de determinar la densidad de siembra óptima.

5

Optimización de la tinción con Hoechst 33342

- La optimización del Hoechst 33342 es importante para proporcionar la relación señal-ruido más fuerte sin precipitar la coloración o destrucción de las células. Hoechst 33342 es un colorante permeable en células que etiqueta los núcleos celulares permitiendo una segmentación y recuento basados en imágenes eficientes. Se ensayan cuatro concentraciones diferentes de Hoechst 33342 (0,5, 1, 5, 10 µM) para comprobar su eficacia. EthD1 es un colorante de ácido nucleico impermeable en membrana que se une al ADN en los núcleos de las células con membranas celulares comprometidas (es decir, células muertas). Se usa EthD1 a una concentración final de 1 µM. Las dos cepas proporcionan una manera sistemática de identificar células vivas/muertas para un recuento celular eficiente.
- Usando 1 placa, Hoechst 33342 se diluye en medio de cultivo celular a las concentraciones operativas indicadas en la siguiente tabla:

Tabla 6

Concentración final H33342 (µM)	Concentración intermedia H33342 (µM)	Colorante en reserva (1 mM)	Medio de dilución (µl)	Volumen final (µl)
0,5	4	1,2	298,8	300
1	8	2,4	297,6	300
5	40	12	288,0	300
10	80	24	276,0	300

Se añaden 10 µl de la solución de tinción a cada pocillo y se incuban durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 % para permitir la captación del colorante. La optimización de imágenes se consigue en la máquina InCell Analyzer 1000.

20 Protocolo de cribado del fármaco:

Día 0: Colocación en placas de las células-placas de 384 pocillos:

- Las células se cosechan y se ponen en placas en dos placas µClear tratadas con CT Grenier Bio One de 384 pocillos basándose en los números de células óptimos en el estudio de optimización del crecimiento celular. Se añaden 50 µl de la solución celular de reserva en la placa de ensayo de acuerdo con el Diseño de la placa de ensayo (120 pocillos/línea celular)

30 *Día 1: Tratamiento del fármaco:*

Se realizaron diluciones seriadas de artículos de ensayo en placas de 96 pocillos. Tras las diluciones de los artículos de ensayo y control, se añaden 20 µl/pocillo x 2 pocillos por concentración de fármaco de acuerdo con el Diseño de la placa de ensayo mostrado a continuación.

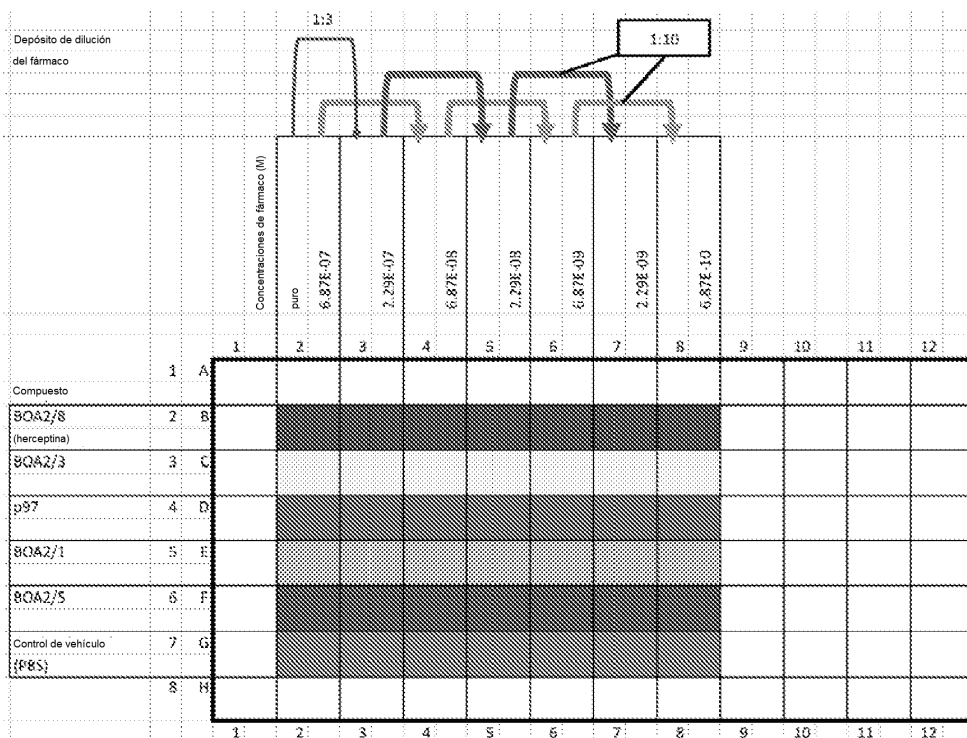


Tabla 7 Depósito de dilución del fármaco ejemplar

La Tabla que se indica a continuación muestra diluciones ilustrativas de reservas para dar soluciones de trabajo deseadas.

5

Tabla 8 Diluciones de reserva para dar una solución de trabajo. Dos basadas en Clin Cancer Res 2004;10: 2512-2524. Publicado en línea el 8 de abril de 2004.

Material	Conc. reserva (moles/ μ l)	Vol. reserva (μ l)	Medio (μ l)	Vol. Total (μ l)	Conc. molar total	Conc. final (μ g/ml)
Herceptina	3,96E-11	17	983	1000	6,87E-07	100
BOA2/1	2,72E-12	253	747	1000	6,87E-07	172
BOA2/3	1,12E-12	614	386	1000	6,87E-07	522
BOA2/5	1,72E-12	400	600	1000	6,87E-07	364
p97	1,32E-10	5	995	1000	6,87E-07	50

*Estas son diluciones para proporcionar 1 ml de material. Una dilución 1 en 10 de esto proporciona 10 μ g/ml de equivalente.

El esquema de dilución usado en la placa es el que se ha descrito anteriormente en "Depósito de dilución de fármaco ejemplar".

Tabla 9

Dilución	Conc. molar final (M)	Equivalentes de herceptina en conc. final (μ g/ml)
pura	6,87E-07	100
1:10	6,87E-08	10
1:100	6,87E-09	1
1:1000	6,87E-10	0,1
1:3,3	2,29E-07	30
1:33	2,29E-08	3
1:333	2,29E-09	0,3

Día 2-3: Incubación:

Las células se incuban con fármaco durante 72 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %, incubadora humidificada.

Día 4: Técnica de imágenes:

5

Las placas se tiñen con Hoechst 33342 (células totales) basándose en el estudio de optimización de la tinción, y homodímero de etidio (células muertas) para determinar los recuentos de células viables. Las placas se someten a técnica de imagen con el sistema de toma de imágenes y análisis celulares GE InCell 1000.

10 RESULTADOS

Usando procedimientos sustancialmente como se ha descrito anteriormente, se ensayaron diversos conjugados de la invención para comprobar la actividad contra líneas celulares de cáncer de mama en comparación con un anticuerpo anti-Her2/neu no conjugado. Los resultados de los ensayos de viabilidad celular se resumen en las 15 figuras 1-4. Sorprendentemente, en algunas líneas celulares de cáncer de mama HER2+, los conjugados de p97-anticuerpo demostraron una mejora significativa en la actividad de destrucción del cáncer en comparación con trastuzumab en solitario. Por ejemplo, para la línea celular BT474 (figura 1), los conjugados BOA2/1 y BOA2/5 mostraron un profundo efecto sobre la muerte celular a 229 nM. El efecto de estos conjugados sobre la viabilidad celular fue mucho más pronunciado que el efecto observado para las células tratadas con trastuzumab en solitario 20 (BOA2/8).

Además, los resultados de otros experimentos confirmaron que trastuzumab no entra en las células endoteliales cerebrales humanas (HBE) en cultivo ni cruza la barrera hematoencefálica intacta en animales. Sin embargo, los conjugados de p97-anticuerpo mostraron un notable transporte en células HBE, sugiriendo que los conjugados 25 tienen el potencial de cruzar la barrera hematoencefálica y entrar en el tejido cerebral.

A la luz de estos hallazgos, es evidente que los conjugados de la presente invención pueden mejorar el potencial terapéutico de los anticuerpos anti-Her2/neu mejorando la actividad de los anticuerpos y/o permitiendo que los anticuerpos accedan a las células de cáncer metastásico que expresa Her2/neu en el SNC.

30

EJEMPLO 3

DISTRIBUCIÓN DE CONJUGADOS DE P97-TRASTUZUMAB EN TEJIDO CEREBRAL

35 Se realizaron experimentos para evaluar la distribución de conjugados de p97-trastuzumab (Herceptin®) en compartimentos de tejido cerebral. En primer lugar, las siguientes proteínas marcadas con rodamina se inyectaron por vía intravenosa en ratones de aproximadamente 23 gramos de tamaño: 100 µg de p97-rodamina en aproximadamente 4,35 mg/kg; 195 µg de p97-rodamina en aproximadamente 8,47 mg/kg; 375 µg de p97-BTA-rodamina en aproximadamente 16,3 mg/kg; y rodamina en solitario.

40

Para las proteínas marcadas, se recogieron tres secciones de 20 µm y tres secciones de 50 µm 2 horas después de la inyección IV, y se recogieron dos secciones de 20 µm y dos secciones de 50 µm 24 horas después de la inyección IV. Para rodamina en solitario, se recogieron cuatro secciones de 20 µm y dos secciones de 50 µm 2 horas después de la inyección IV. Estas secciones se enviaron a la instalación de análisis de imágenes iCapture para un análisis 45 confocal.

El número de vóxeles se midió en las secciones de 20 micrómetros del compartimento vascular (capilares) y el parénquima cerebral (todos los tejidos excepto el compartimento vascular). Un voxel es un píxel tridimensional tomado de imágenes confocales de una sección de tejido. El número de vóxeles fluorescentes en el parénquima 50 cerebral se dividió por el número total de vóxeles para dar la fracción en volumen de un conjugado determinado en el parénquima. El número de vóxeles fluorescentes en los capilares cerebrales se dividió por el número total de vóxeles para dar la fracción en volumen de un conjugado en la vasculatura (capilares).

Los resultados se muestran en las figuras 5A-5D. En estas figuras "MTf" es p97 y "BTA" es trastuzumab. La figura 55 5A muestra la distribución de p97-trastuzumab (BT2111; MTf-BTA) en tejido cerebral al normalizarse a la dosis inyectada, y la figura 5B muestra lo mismo cuando al normalizarse a fluorescencia. Aquí, la mayor parte de las proteínas fluorescentes se encuentran en los capilares, pero con respecto a p97 en solitario o trastuzumab en solitario, el conjugado de p97-trastuzumab se distribuye selectivamente al parénquima, especialmente en el punto temporal de 2 horas. Este resultado se ilustra adicionalmente en la figura 5C, que muestra una fluorescencia

significativamente aumentada localizada en el parénquima cerebral para el conjugado de p97-trastuzumab, y la figura 5D, que muestra que los niveles parénquimales del conjugado de p97-trastuzumab son 12 veces mayores que trastuzumab en solitario y 4 veces mayores que p97 en solitario.

- 5 Estos hallazgos sugieren que la combinación de p97 y trastuzumab como un conjugado de proteína aumenta sinérgicamente la administración a tejidos del parénquima cerebral a través de la barrera hematoencefálica, con respecto a la administración de cada proteína en solitario.

EJEMPLO 4

10

DISTRIBUCIÓN DE CONJUGADOS DE P97-TRASTUZUMAB EN METÁSTASIS CEREBRALES

Se realizaron experimentos para evaluar la distribución del conjugado de p97 marcado con ^{125}I -trastuzumab en tejido cerebral normal y metástasis cerebrales, con respecto a trastuzumab en solitario. También se examinó la 15 distribución relativa en tejidos sistémicos.

La administración de fármacos intravenosos de p97 radiomarcado, trastuzumab y p97-trastuzumab se realizó en ratones que tenían metástasis cerebrales experimentales de cáncer de mama. Específicamente, estos experimentos tumorales utilizaron ratones NuNu inmunodeprimidos (Charles River Labs) a los que se implantó a través de 20 inyección intracardiaca células de cáncer de mama MDA-MB-231 BR High Her-2 humano que expresaba eGFP. Se dejó que las células tumorales se implantasen en el cerebro y formasen metástasis cerebrales durante un periodo de aproximadamente 3-6 semanas.

Se administraron vez fármacos de ensayo una vez que los animales comenzaron a mostrar síntomas de crecimiento 25 tumoral. Después, se realizó el control de la distribución tisular por análisis radioactivo, fluorescente y de autoradiografía cuantitativa. Estos experimentos se realizaron usando las proteínas p97 marcado con ^{125}I , trastuzumab y p97-trastuzumab a una pureza de >99 %, según se midió por HPLC.

La captación de proteínas radiomarcadas se examinó en los puntos temporales de dos, ocho y 24 horas. También 30 se administró rojo Texas-dextrano (i.v.) a aproximadamente 10 min -2 hr antes de la eutanasia para medir la permeabilidad pasiva de la barrera sangre-tumor. Los cerebros se perfundieron con albúmina al 2,7 % y verde de yodocianuro durante aproximadamente 30-60 segundos después de la eutanasia para mapear la distribución de los vasos sanguíneos en el cerebro y las metástasis cerebrales, y para eliminar la proteína marcada intravascular. Los cerebros se congelaron inmediatamente después del lavado de perfusión y se cortaron en secciones coronales de 35 20 μm coronal usando un criostato. Las secciones se analizaron por fluorescencia verde, roja y casi infrarroja, para mapear respectivamente la distribución cerebral de las células tumorales, cuantificar la permeabilidad de la barrera sangre-tumor, y localizar la vasculatura en los tumores. En secciones tisulares coincidentes, la distribución de la ^{125}I -proteína en el cerebro se midió por imágenes de fosforescencia junto con estándares radioactivos. Después del análisis, las secciones tisulares se tiñeron para confirmar la distribución de las células tumorales. También se realizó 40 una disección para medir y comparar el nivel/distribución de la ^{125}I -proteína (dpm/g) en otros tejidos, incluyendo el hígado, riñones, pulmón, corazón, bazo, músculo y grasa.

Se usó análisis por imagen para determinar el nivel de proteína marcada con ^{125}I en las metástasis cerebrales 45 seleccionadas y cerebro normal circundante, y para obtener imágenes auto-radiográficas expresadas en unidades de nCi/g de tejido o ng de proteína/g de tejido. La captación de las proteínas marcadas en metástasis cerebral se analizó en relación con el tamaño de la metástasis, la permeabilidad de la barrera sangre-tumor, y el tiempo de circulación. También se realizaron cálculos para medir el porcentaje de dosis/g o ml de fármaco intacto en el cerebro, metástasis cerebral, sangre y otros tejidos.

50 Los resultados se muestran en las figuras 6-10. Las figuras 6 y 7 muestran los resultados para trastuzumab marcado con ^{125}I , y las figuras 8-10 muestran los resultados para el conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I .

Las figuras 6A-6F muestran la distribución de trastuzumab marcado con ^{125}I en el cerebro de ratón 24 horas después de una administración intravenosa. La figura 6A muestra metástasis cerebrales de tamaño heterogéneo en las 55 regiones señaladas en rojo, y la figura 6B muestra la tinción con rojo Texas-dextrano de las metástasis. La figura 6C muestra un autoradiograma de trastuzumab marcado con ^{125}I , e indica el número de pliegues en el anticuerpo con respecto al tejido cerebral normal circundante. Aquí, el trastuzumab marcado con ^{125}I está en el límite de detección. Como se muestra en la figura 6F, los valores de K_{in} para trastuzumab en solitario son aproximadamente $1,46 \times 10^{-7}$ ml/s/g en tejido cerebral normal y aproximadamente $3,8 \times 10^{-7}$ ml/s/g en metástasis cerebrales, valores de K_{in}

relativamente bajos para una proteína y aproximadamente -1000 menores que los valores de K_{in} para el conjugado de p97-trastuzumab.

Las figuras 7A-7D muestran la distribución de trastuzumab marcado con ^{125}I en el cerebro de ratón y otros tejidos 5 24 horas después de una administración intravenosa. La figura 7A muestra metástasis cerebrales de tamaño heterogéneo en las regiones señaladas en rojo, y la figura 7B muestra la tinción con rojo Texas-dextrano de las metástasis. La figura 7C muestra en autoradiograma de trastuzumab marcado con ^{125}I , e indica el número de pliegues en el anticuerpo con respecto al tejido cerebral normal circundante. La figura 7D muestra la relación tejido-sangre de trastuzumab marcado con ^{125}I en diversos tejidos. Aquí, trastuzumab se distribuye en los órganos con una 10 relación tejido-sangre de aproximadamente 0,2 a 0,3 para los pulmones y el bazo, y la distribución en el corazón es bastante alta con respecto al hígado. La distribución en tejido cerebral normal y metástasis cerebrales es comparativamente baja (véase el cuadro en la figura 7D). La relación de 0,02 para cerebro/sangre es muy baja y únicamente ligeramente superior a la encontrada en el espacio vascular (es decir, la cantidad de trastuzumab que se encuentra en la vasculatura del cerebro, que está entre aproximadamente 0,01 y 0,02). Se observa muy poca 15 captación en metástasis cerebrales a pesar de que estas metástasis demuestran una filtración significativa (véase la figura 7B).

Las figuras 8A-8F muestran la distribución de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I en el cerebro de ratón y otros tejidos dos horas después de una administración intravenosa. La figura 8A muestra metástasis cerebrales de 20 tamaño heterogéneo en las regiones señaladas en rojo, y la figura 8B muestra la tinción con rojo Texas-dextrano de las metástasis. La figura 8C muestra un autoradiograma de conjugados de p97-trastuzumab marcados con ^{125}I , y la parte izquierda de la figura 8C indica la cantidad (ng/g) de conjugado que se observa en cada metástasis. La parte izquierda de la figura 8B muestra el aumento de pliegues de conjugado de p97-trastuzumab que se observa en cada metástasis, con respecto a la región cerebral alejada del tumor (BDT) mostrada en la figura 8A. La figura 8D muestra 25 la relación tejido/sangre del conjugado de p97-trastuzumab para una diversidad de tejidos. Aquí, la distribución al corazón es significativamente menor que la distribución a otros tejidos (por ejemplo, aproximadamente 10 veces menos que al pulmón, hígado y bazo). La figura 8E muestra la relación del conjugado de p97-trastuzumab en cerebro normal/sangre y metástasis cerebrales/sangre. La relación para cerebro normal/sangre es de aproximadamente 0,06 (en comparación con 0,04 para p97 marcado con ^{125}I en solitario, datos no mostrados), y la 30 relación para metástasis cerebrales/sangre es de aproximadamente 0,14 (en comparación con 0,06 para p97 marcado con ^{125}I en solitario, datos no mostrados). La figura 8F resume la concentración de conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I que se observa en las metástasis cerebrales individuales, con concentraciones variables de aproximadamente 25-175 ng/g de tejido.

Las figuras 9A-9F muestran la distribución de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I en el cerebro de ratón y otros tejidos ocho horas después de una administración intravenosa. La figura 9A muestra metástasis cerebrales de 35 tamaño heterogéneo en las regiones señaladas en rojo, y la figura 9B muestra la tinción con rojo Texas-dextrano de las metástasis. La figura 9C muestra un autoradiograma de conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I , y la parte izquierda de la figura 9C indica la cantidad (ng/g) de conjugado que se observa en cada metástasis. La parte 40 izquierda de la figura 9B muestra el aumento de pliegues de conjugado de p97-trastuzumab que se observa en cada metástasis, con respecto a las regiones cerebrales alejadas del tumor (BDT) mostradas en la figura 9A. La figura 9D muestra la relación tejido/sangre del conjugado de p97-trastuzumab para una diversidad de tejidos. Aquí, la distribución de p97-trastuzumab al corazón es significativamente menor que la distribución a otros tejidos. La figura 9E muestra la relación del conjugado de p97-trastuzumab en cerebro normal/sangre y metástasis cerebrales/sangre, 45 donde la relación en cerebro normal/sangre es de aproximadamente 0,04 (en comparación con 0,06 para el punto temporal de dos horas, véase la figura 8E), y la relación en metástasis cerebrales/sangre es aproximadamente 0,44 (en comparación con 0,14 para el punto temporal de dos horas, véase la figura 8E). La figura 9F resume la concentración de conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I que se observa en las metástasis cerebrales individuales, concentraciones variables de aproximadamente 25-125 ng/g de tejido.

Las figuras 10A-10E resumen los datos de los puntos temporales de dos y ocho horas tras la administración intravenosa de conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I . La figura 10A muestra la relación tejido/sangre del 50 conjugado de p97-trastuzumab para una diversidad de tejidos. Las relaciones no varían demasiado entre los puntos temporales de dos y ocho horas; sin embargo, la relación (niveles) de conjugado en tejido cardiaco son significativamente inferiores que en los demás tejidos (por ejemplo, aproximadamente 10 veces inferiores que en 55 tejidos de pulmón e hígado). Por el contrario, la distribución de trastuzumab en solitario en tejido cardiaco fue similar en el hígado (véase la figura 7D). La figura 10B muestra que los niveles de conjugado en tejido cerebral normal son ligeramente inferiores en el punto temporal de ocho horas (con respecto al punto temporal de dos horas), y los niveles de conjugado en metástasis cerebrales son significativamente superiores en ese mismo punto temporal. La

figura 10C muestra los valores de K_{in} medidos para el conjugado de p97-trastuzumab en tejido cerebral normal ($1,1 \times 10^{-4}$ ml/s/g) y metástasis cerebrales ($4,9 \times 10^{-4}$ ml/s/g). En comparación con los valores de K_{in} para trastuzumab (véase la figura 6F), el conjugado p97-trastuzumab se transporta al cerebro aproximadamente 1000 veces más rápidamente que trastuzumab en solitario. La figura 10D muestra el porcentaje de dosis inyectada en tejido cerebral en 2 y 8 horas, y la figura 10E resume la concentración de conjugado de p97-trastuzumab marcado con ^{125}I en metástasis cerebrales individuales dos y ocho horas después de la administración.

El perfil farmacocinético de los conjugados de p97-trastuzumab también se calculó en base a los datos de los puntos temporales de dos y ocho horas. Estos datos se muestran en la Tabla 10 a continuación.

10

Tabla 10

Parámetro	Valor	Unidad
K_e	0,297	h^{-1}
V_d	10,76	ml
$t_{1/2}$	2,32	h
Cl	3,202	ml/h
$AUC_{0-\infty}$	2,523	$\mu Ci \times h/ml$
Dosis	8,08	$\mu Ci/ml$
F	1	[Sin unidad]

En general, estos datos sugieren en gran medida que pueden conseguirse concentraciones terapéuticamente eficaces del conjugado de p97-trastuzumab en metástasis de tejido cerebral, incluso por administración sistémica (por ejemplo, intravenosa) de dichos conjugados. Estos datos también sugieren que p97 y trastuzumab actúan sinérgicamente juntos para dirigir selectivamente los conjugados de p97-trastuzumab a las metástasis cerebrales con respecto al tejido cerebral normal, y a una velocidad significativamente mayor (~1000 veces) que trastuzumab en solitario. Por lo tanto, la conjugación con p97 no sólo aumenta el transporte de trastuzumab a través de la barrera hematoencefálica, sino también a través de la barrera sangre-tumor. Además, debido a la reducida distribución a los tejidos cardiacos con respecto a otros tejidos, estos datos sugieren que la conjugación con p97 puede reducir los efectos cardiotóxicos de los anticuerpos, tal como trastuzumab.

EJEMPLO 5

25 PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DE P97-CETIXUMAB Y ENSAYOS PARA COMPROBAR LA CITOTOXICIDAD *IN VITRO*

Se realizan ensayos de eficacia anticáncer *in vitro* en dos líneas celulares de cáncer humanas, A-431 y HT-29, para evaluar las eficacias relativas como la CI_{50} de cetuximab y conjugados de p97-cetuximab, con respecto a p97 en solitario y solución salina tamponada con fosfato (PBS) como vehículos de control. La línea celular A-431 es un carcinoma epidermoide humano que expresa EGFR y la línea celular HT-29 es un adenocarcinoma colorrectal humano.

Como se ha indicado anteriormente, p97 (melanotransferrina) es una sialoglicoproteína monomérica que pertenece a la familia de proteínas de unión a hierro que incluyen transferrina, lactoferrina y ovotransferrina. Se identificó originalmente como una proteína unida a membrana, vinculada a GPI de 97 kD sobre la superficie de las células de melanoma y se designó como el antígeno p97 asociado a melanoma. Se ha producido una forma soluble (82 kD) que carece del anclaje GPI usando técnicas recombinantes. Cetuximab (Erbix[®]) es un fármaco de anticuerpo monoclonal de IgG₁ humana aprobado para su uso para tratar ciertos cánceres humanos actuando sobre el dominio extracelular de EGFR y su mecanismo de acción se refiere al bloqueo de la activación de EGFR interfiriendo con la unión a ligandos.

Los conjugados de p97-cetuximab se prepararon uniendo covalentemente p97 soluble a cetuximab a través de un enlace tioéter. La figura 11A muestra un perfil de HPLC de la mezcla de reacción en bruto después de 24 horas a temperatura ambiente.

Después, el producto de reacción se analizó por HPLC de exclusión por tamaño para determinar la concentración y por SDS-PAGE para determinar el peso molecular. Se diluyó 10 veces una alícuota del conjugado de p97-cetuximab concentrado y esterilizado con 1 x PBS, y se inyectó una alícuota en la columna de exclusión por tamaño por HPLC. Como se muestra en la figura 11B, el perfil de elución mostró un pico máximo (96 %) con un Tr de 8,875 minutos,

antes que el de cetuximab (9,70 min) o p97 (10,03 min). El área del pico en 220 nm (1856,9) se usó junto con las curvas estándar de p97 y cetuximab para determinar la concentración del producto en 4,0 mg/ml.

Para los análisis SDS-PAGE, las muestras de proteínas purificadas o la mezcla de reacción (1 µg cada una) se analizaron en un gel bis-tris al 4 %-12 % con tampón de realización 1 x MES SDS en condiciones no reductoras (Invitrogen NuPAGE® Novex® 1-12% Bis-Tris midi gel). El gel se procesó a una velocidad constante 125 V durante 150 minutos y se tiñó con SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen). Como se muestra en la figura 12, el peso molecular del conjugado se estimó en aproximadamente 230 KDa en base a las comparaciones con los estándares del peso molecular de la escalera de proteína; esta estimación es congruente con una relación 1:1 de p97-cetuximab.

Para los ensayos de actividad *in vitro*, en primer lugar, las células A-431 se propagan en medio de Eagle modificado por Dulbecco formulado en la ATCC que incluye FBS al 10 %, y las células HT-29 se propagan en medio modificado McCoy's 5a formulado por la ATCC que incluye FBS al 10 %. Para garantizar unos resultados de ensayo de CI₅₀ fiables, las condiciones de cultivo óptimas se verifican basándose en la morfología celular por microscopía, tiempo de duplicación de la proliferación controlado por ensayo de exclusión azul de tripano, y datos de la relación de división celular antes del tratamiento con agentes de ensayo.

Se realizan ensayos de CI₅₀ en placas de 96 pocillos de fondo plano por triplicado para cada punto de concentración de agente de ensayo y todos los controles en dos concentraciones de suero fetal bovino (FBS) del 1 % y el 10 % durante el periodo de incubación del tratamiento de 3 días. Los agentes de ensayo y los controles se administran a cada uno de los cultivos de línea celular en ocho concentraciones que incluyen un rango de dosis de 1000 veces en base a la CI₅₀ de cetuximab en líneas celulares de tumor humanas relacionadas. Específicamente, se evalúan un total de ocho concentraciones de agente de ensayo en una escala de concentración semi-logarítmica para cada uno de los dos agentes de ensayo, cetuximab y p97-cetuximab, y el control (p97) y el vehículo (PBS) en PBS a las concentraciones mostradas en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11

Artículos y controles de ensayo	Concentraciones de ensayo (µg/ml)
Cetuximab (control positivo)	0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10, 30, 100 y 300
P97-cetuximab	0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10, 30, 100 y 300
MTf	0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10, 30, 100 y 300
PBS (vehículo de control)	Volumen con adiciones al 10 % con respecto al medio de incubación

Después de 72 horas de incubación de los agentes de ensayo en cada uno de los dos cultivos celulares, se realizaron ensayos de citotoxicidad MTT para la evaluación de la apoptosis celular de acuerdo con BRI SOP: SOP-TM-GEN-029 (ensayo MTT). Después, se general los valores de CI₅₀ y las curvas de respuesta al fármaco con un lector de placas SpectraMax™ M2 ejecutado por el software SpectraMax™ (Molecular Devices) y SigmaPlot™ V5.0.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> biOasis Technologies, Inc. Hutchison, Rob Vitalis, Timothy Z. Gabathuler, Reinhard
- <120> Conjugados de P97-anticuerpo y métodos de uso
- <130> BIOA-003-02wO 315702-2012
- <150> US 61/504.646
- <151> 05-07-2011
- <150> US 61/658.217
- <151> 11-06-2012
- <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 738
- <212> PRT

ES 2 582 869 T3

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Arg Gly Pro Ser Gly Ala Leu Trp Leu Leu Leu Ala Leu Arg Thr
 1          5          10          15

Val Leu Gly Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu
          20          25          30

Gln His Lys Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile
          35          40          45

Gln Pro Ser Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val
          50          55          60

Gln Leu Ile Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly
65          70          75          80

Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly
          85          90          95

Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val
          100          105          110

Val Arg Arg Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys
          115          120          125

Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val
          130          135          140

```

5

ES 2 582 869 T3

Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val
145 150 155 160

Leu Lys Ala Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala
165 170 175

Gly Glu Thr Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp
180 185 190

Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr
195 200 205

Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val
210 215 220

Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr
225 230 235 240

Leu Pro Ser Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu
245 250 255

Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His
260 265 270

Leu Ala Arg Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp
275 280 285

Gly Gly Leu Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser
290 295 300

His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln
305 310 315 320

Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala
325 330 335

Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met
340 345 350

Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp
355 360 365

Cys Val Leu Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val
370 375 380

Ala Phe Arg Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala
385 390 395 400

ES 2 582 869 T3

Lys Ser Pro Gln His Cys Met Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp
 405 410 415
 Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Thr Tyr
 420 425 430
 Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser
 435 440 445
 Asn Ser Tyr Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala
 450 455 460
 Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe
 465 470 475 480
 Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg
 485 490 495
 Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu
 500 505 510
 Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro
 515 520 525
 Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys
 530 535 540
 Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe
 545 550 555 560
 Arg Cys Leu Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr
 565 570 575
 Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala
 580 585 590
 Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg
 595 600 605
 Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro
 610 615 620
 His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly
 625 630 635 640
 Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn

ES 2 582 869 T3

645 650 655

Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu
660 665 670

Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr
675 680 685

Tyr Arg Gly Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met
690 695 700

Ser Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro
705 710 715 720

Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Ala Leu Ala Ala Arg Leu Leu Pro Pro
725 730 735

Ala Leu
<210> 2
<211> 1255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 2

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro

ES 2 582 869 T3

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620

ES 2 582 869 T3

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
850 855 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
865 870 875 880

ES 2 582 869 T3

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
945 950 955 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
1085 1090 1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val

ES 2 582 869 T3

1115		1120		1125
Ala Pro	Leu Thr Cys Ser	Pro Gln Pro Glu Tyr Val	Asn Gln Pro	
1130		1135	1140	
Asp Val	Arg Pro Gln Pro	Pro Ser Pro Arg Glu Gly	Pro Leu Pro	
1145		1150	1155	
Ala Ala	Arg Pro Ala Gly	Ala Thr Leu Glu Arg Pro	Lys Thr Leu	
1160		1165	1170	
Ser Pro	Gly Lys Asn Gly	Val Val Lys Asp Val	Phe Ala Phe Gly	
1175		1180	1185	
Gly Ala	Val Glu Asn Pro	Glu Tyr Leu Thr Pro	Gln Gly Gly Ala	
1190		1195	1200	
Ala Pro	Gln Pro His Pro	Pro Pro Ala Phe Ser Pro	Ala Phe Asp	
1205		1210	1215	
Asn Leu	Tyr Tyr Trp Asp	Gln Asp Pro Pro Glu Arg	Gly Ala Pro	
1220		1225	1230	
Pro Ser	Thr Phe Lys Gly	Thr Pro Thr Ala Glu Asn	Pro Glu Tyr	
1235		1240	1245	
Leu Gly	Leu Asp Val Pro	Val		
1250		1255		

<210> 3
 <211> 3963
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3
 cacttaagga gctcgggcca gcgcgagggg gaggcaggag gaagcccggc tgctgaggac 60
 ctctcaggac ccggaccag ccccagcccg gcccagcca gcccgacgg cggcatgagg 120
 ggtccgagcg gggctctgtg gctgctctg gctctgcgca ccgtgctcgg tggcatggag 180
 gtgcggtggt gcgccacctc ggaccagag cagcacaagt gcggcaacat gaggcaggcc 240
 ttccgggaag cgggcatcca gccctccctc ctctgcgtcc ggggcacctc cggcaccac 300
 tgcgtccagc tcatcgcggc ccaggaggct gacgccatca ctctggatgg aggagccatc 360
 tatgaggcgg gaaaggagca cggcctgaag ccggtggtgg gcgaagtgta cgatcaagag 420
 gtcggtacct cctattacgc cgtggctgtg gtcaggagga gctcccatgt gaccattgac 480
 accctgaaag gcgtgaagtc ctgccacacg ggcacatcaatc gcacagtggg ctggaacgtg 540

ES 2 582 869 T3

cccgtgggct acctggtgga gagcgccgc ctctcgggta tgggctgcga tgtactcaaa 600
 gctgtcagcg actatthtgg gggcagctgc gtccccgggg caggagagac cagttactct 660
 gagtccctct gtgcctctg caggggtgac agctctgggg aaggggtgtg tgacaagagc 720
 cccctggaga gatactacga ctacagcggg gccttccggt gcctggcggg aggggcaggg 780
 gacgtggcct ttgtgaagca cagcacggta ctggagaaca cggatgggaa gacgcttccc 840
 tcctggggcc aggccctgct gtcacaggac ttcgagctgc tgtgccggga tggtagccgg 900
 gccgatgtca ccgagtggag gcagtgccat ctggccccgg tgectgctca cgcctgggtg 960
 gtccgggccg acacagatgg gggcctcatc ttccggctgc tcaacgaagg ccagcgtctg 1020
 ttcagccacg agggcagcag cttccagatg ttcagctctg aggcctatgg ccagaaggat 1080
 ctactcttca aagactctac ctcgagctt gtgcccatcg ccacacagac ctatgaggcg 1140
 tggctggggc atgagtacct gcacgccatg aaggtctgc tctgtgacct caaccggctg 1200
 cccccctacc tgcgctgggt tgtgctctcc actcccgaga tccagaagtg tggagacatg 1260
 gccgtggcct tccgccggca gcggctcaag ccagagatcc agtgcggtgc agccaagtcc 1320
 ccccaacact gcatggagcg gatccaggct gagcaggtcg acgctgtgac cctgagtggc 1380
 gaggacattt acacggcggg gaagacgtac ggctgggttc ccgacgccgg ggagcactat 1440
 gccccggaag acagcagcaa ctcgactac gtggtggccg tggtagagcg ggacagctcc 1500
 cacgccttca ccttggatga gcttcggggc aagcgtcct gccacgccgg tttcggcagc 1560
 cctgcaggct gggatgtccc cgtgggtgcc cttattcaga gaggttcat ccggcccaag 1620
 gactgtgacg tcctcacagc agtgagcag tttctcaatg ccagctgctg gccctggaac 1680
 aacccaaga actaccctc ctgctgtgt gcactgtgcg tgggggacga gcagggccgc 1740
 aacaagtgtg tgggcaacag ccaggagcgg tattacggct accgcccgc cttcaggtgc 1800
 ctggtggaga atgcgggtga cgttgcctc gtcaggcaca caaccgtctt tgacaacaca 1860
 aacggccaca attccgagcc ctgggctgct gagctcaggt cagaggacta tgaactgctg 1920
 tgccccaacg gggcccagc cgaggtgtcc cagtttgac cctgcaacct ggacagata 1980
 ccacccacg ccgtgatggt ccggcccagc accaacatct tcaccgtgta tggactgctg 2040
 gacaaggccc aggacctggt tgagagcagc cacaataaga acgggttcaa aatgttcgac 2100
 toctccaact atcatggcca agacctgctt ttcaaggatg ccaccgtccg ggcggtgcct 2160
 gtcggagaga aaaccaccta ccgcggtgg ctggggctgg actacgtggc ggcgctggaa 2220
 gggatgtcgt ctcagcagtg ctcgggcga gcggccccgg cggccggggc gccctgctc 2280
 ccgctgctgc tgcccgcct cgcggcccgc ctgctcccgc ccgccctctg agcccggccg 2340
 ccccgccca gagctccgat gccgcccgg ggagtttccg cggcggcttc gcgctggaat 2400
 ccagaaggaa gctcgcgaag gccgggcccg gcgtgggcgg gagcaggcgc ctccccggga 2460

ES 2 582 869 T3

gccccgccgc ccacggggcg cacctggcgc tgctacctga ggcgccgcc ccgggcccg 2520
 gcggcccttc ccgccaaccg ccgcctcccg ccacctggag ccgcgcgggc cgcgccggag 2580
 gaggccgggtt gccagggaaa ccgctgagtc cgggcttccc gccgccgcc ccgcgggtgc 2640
 gcccgagggg cccgcccgcc tcctccccgc agccccgcgc ccccgccgc gaggccccct 2700
 ggggacgcgg tggccgccga ggcgcctaca cccgcaggcc gcggccaggc cgtcccagga 2760
 ggccccggcg ccaacgggac ccggcgcgtg ggacagcggc ctctgctggc ggcgcgggga 2820
 gggaggccgg accggggcga cggggagaag ccttcgcccg cgggaccgtg tccggggtgg 2880
 gggctccagt tcctccgacc gccctgcgcc tgggagggag gccgagcccg gggaaccgcg 2940
 cgtgccctgc ctgctcccc actgtggcgc cgcagctcc atccccggcc agccgcgtcc 3000
 acgggcccc tcccaggtct cctcaggctc tcgcctcccc taccgccgtg ggatgccac 3060
 cccccgcacc cacgcccag cctggcggca gcagccgcc cccgcctgaa gggagccgga 3120
 ggtgaccag gccgcgggct cccgaggccc ctgaagggtc gcgcgtgggg acccgccatg 3180
 cttctgggtt ccgaacgggg gtgagctccg tctcctcacc cggccccgca cccgctgggc 3240
 ctggggacc ctoactcccc gtgcccgcc ctccgcgagg cagcagaaaag cggccggccg 3300
 gggcctctct ctactccatc ttgccacagt tgtctgagaa gccagaaaaa gtttccagaa 3360
 ctggcagccc ttaaaaaaaaa tgaagaggaa gagaagaaat gggagcaggc agccctcgtc 3420
 agcagaccgg gagccgcgtg ggcgcggagc catttgcat cccgtctgcg ggggctcggg 3480
 gatgctggtg acaggcccgg ttcccgggtg ctgcgcccga cctgcgggcg tcggaagga 3540
 tcccttccat ctctcagccg cagaggaggc cctggcagcg ccccgctgt agccatgcaa 3600
 ccccaggag tccggggcac cttcaccoca ccgggagggg ccacaaggac ctgggcctcg 3660
 gccaccaagc tttgtcccct ctgcctgtgg ggggctagtg attctcctcc gacctgacga 3720
 ttgcttggtt ttttcaaaaag ggagttttgt gcggtgagaa gtgtgtttct gtgtggctaa 3780
 ctctgggcta gcgtgccgtg gccattgaag gtgtggcctg cgtgggtgca gtgtaagtga 3840
 cgctggattg tcaggtggca gcaggggacc cctgctgtgt cagtgctaat gaaacatggt 3900
 ggttggtttc taaaataaag ccaacaagc cagcacatgc agaggcttgg accctgatag 3960
 aaa 3963
 <210> 4
 <211> 4624
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 ggaggaggtg gaggaggagg gctgcttgag gaagtataag aatgaagttg tgaagctgag 60
 attcccctcc attgggaccg gagaaaccag gggagcccc cgggcagccg cgcgccctt 120

5

ES 2 582 869 T3

cccacggggc cctttactgc gccgcgcgcc cggccccac ccctcgcagc accccgcgcc 180
 ccgcgccctc ccagccgggt ccagccggag ccatggggcc ggagccgcag tgagcaccat 240
 ggagctggcg gccttgtgcc gctgggggct cctcctcgc cctctgcccc ccggagccgc 300
 gagcaccxaa gtgtgcaccg gcacagacat gaagctgcgg ctccctgcc gtcccgcagc 360
 ccacctggac atgtccgcc acctctacca gggctgccag gtggtgcagg gaaacctgga 420
 actcacctac ctgcccacca atgccagcct gtccttcctg caggatatcc aggaggtgca 480
 gggctacgtg ctcatcgctc acaaccaagt gaggcaggtc ccaactgcaga ggctgcggat 540
 tgtgcgagge acccagctct ttgaggacaa ctatgccctg gccgtgctag acaatggaga 600
 cccgctgaac aataccaccc ctgtcacagg ggctcccca ggaggcctgc gggagctgca 660
 gcttcgaagc ctcacagaga tcttgaaggg aggggtcttg atccagcggg acccccagct 720
 ctgctaccag gacacgattt tgtggaagga catctccac aagaacaacc agctggctct 780
 cacactgata gacaccaacc gctctcgggc ctgccacccc tgttctccga tgtgtaaggg 840
 ctcccgtgc tggggagaga gttctgagga ttgtcagagc ctgacgcgca ctgtctgtgc 900
 cgggtggctgt gcccgtgca aggggccact gccactgac tgctgccatg agcagtgctg 960
 tgccggctgc acgggcccc aagcactctga ctgcctggcc tgcctccact tcaaccacag 1020
 tggcatctgt gagctgcact gccagccct ggtcacctac aacacagaca cgtttgagtc 1080
 catgcccatt cccgagggcc ggtatacatt cggcgccagc tgtgtgactg cctgtcccta 1140
 caactacctt tctacggagc tgggatcctg caccctcgtc tgccccctgc acaaccaaga 1200
 ggtgacagca gaggatggaa cacagcgggt tgagaagtgc agcaagccct gtgcccagat 1260
 gtgctatggt ctgggcatgg agcacttgcg agaggtgagg gcagttacca gtgccaatat 1320
 ccaggagttt gctggctgca agaagatctt tgggagcctg gcatttctgc cggagagctt 1380
 tgatggggac ccagcctcca aactgcccc gctccagcca gagcagctcc aagtgttga 1440
 gactctggaa gagatcacag gttacctata catctcagca tggccggaca gcctgcctga 1500
 cctcagcgtc ttccagaacc tgcaagtaat ccggggacga attctgcaca atggcgctta 1560
 ctogctgacc ctgcaagggc tgggcatcag ctggctgggg ctgcgctcac tgagggaaact 1620
 gggcagtgga ctggccctca tccaccataa caccacctc tgcttcgtgc acacggtgcc 1680
 ctgggaccag ctctttcgga acccgacca agctctgctc cacactgcca accggccaga 1740
 ggacgagtgt gtggcgagg gcctggcctg ccaccagctg tgcgcccgag ggcactgctg 1800
 gggccaggc cccaccaggt gtgtcaactg cagccagttc cttcggggcc aggagtgctg 1860
 ggaggaatgc cgagtactgc aggggctccc caggagatgt gtgaatgcca ggcactgttt 1920
 gccgtgccac cctgagtgct agccccagaa tggctcagtg acctgttttg gaccggaggc 1980

ES 2 582 869 T3

tgaccagtgt gtggcctgtg cccactataa ggaccctccc ttctgcgtgg cccgctgccc 2040
 cagcgggtgtg aaacctgacc tctcctacat gcccatctgg aagtttccag atgaggaggg 2100
 cgcgatgccag ccttgcccca tcaactgcac ccactcctgt gtggacctgg atgacaaggg 2160
 ctgccccgcc gagcagagag ccagccctct gacgtccatc atctctgcgg tggttggcat 2220
 tctgctggtc gtggtcttgg ggggtgtctt tgggatcctc atcaagcgac ggcagcagaa 2280
 gatccggaag tacacgatgc ggagactgct gcaggaaacg gagctggtgg agccgctgac 2340
 acctagcggg gcgatgcccc accaggcgca gatgcggatc ctgaaagaga cggagctgag 2400
 gaaggtgaag gtgcttggat ctggcgcttt tggcacagtc tacaagggca tctggatccc 2460
 tgatggggag aatgtgaaaa ttccagtggc catcaaagtg ttgagggaaa acacatcccc 2520
 caaagccaac aaagaaatct tagacgaagc atacgtgatg gctggtgtgg gctccccata 2580
 tgtctcccg cttctgggca tctgcctgac atccacggtg cagctggtga cacagcttat 2640
 gccctatggc tgcctcttag accatgtccg ggaaaaccgc ggacgcctgg gctcccagga 2700
 cctgctgaac tgggtgatgc agattgcaa ggggatgagc tacctggagg atgtgcggct 2760
 cgtacacagg gacttggccg ctcggaacgt gctggtcaag agtcccaacc atgtcaaaat 2820
 tacagacttc gggctggctc ggctgctgga cattgacgag acagagtacc atgcagatgg 2880
 gggcaagggt cccatcaagt ggatggcgct ggagtccatt ctccgccggc ggttcaccca 2940
 ccagagtgat gtgtggagtt atggtgtgac tgtgtgggag ctgatgactt ttggggccaa 3000
 accttacgat gggatcccag cccgggagat ccctgacctg ctggaaaagg gggagcggct 3060
 gccccagccc cccatctgca ccattgatgt ctacatgatc atggtcaa atgttgatgat 3120
 tgactctgaa tgtcggccaa gattccggga gttggtgtct gaattctccc gcatggccag 3180
 ggacccccag cgctttgtgg tcatccagaa tgaggacttg ggcccagcca gtccttggga 3240
 cagcaccttc taccgctcac tgctggagga cgatgacatg ggggacctgg tggatgctga 3300
 ggagtatctg gtaccccagc agggcttctt ctgtccagac cctgccccgg gcgctggggg 3360
 catggtccac cacaggcacc gcagctcatc taccaggagt ggcggtgggg acctgacct 3420
 agggctggag cctctgaag aggaggcccc caggtctcca ctggcaccct ccgaaggggc 3480
 tggctccgat gtatgtgatg gtgacctggg aatgggggca gccaaagggc tgcaaagcct 3540
 cccacacacat gaccccagcc ctctacagcg gtacagttag gaccccacag taccctgccc 3600
 ctctgagact gatggctacg ttgccccctt gacctgcagc ccccagcctg aatatgtgaa 3660
 ccagccagat gttcggcccc agcccccttc gccccgagag ggcctctgc ctgctgcccc 3720
 acctgctggt gccactctgg aaaggcccaa gactctctcc ccagggaaga atggggtcgt 3780
 caaagacggt tttgcctttg ggggtgccgt ggagaacccc gagtacttga cccccaggg 3840
 aggagctgcc cctcagcccc acctcctcc tgccttcagc ccagccttcg acaacctcta 3900

ES 2 582 869 T3

ttactgggac caggaccac cagagcggg ggctccacc agcacctca aaggacacc 3960
 tacggcagag aaccagagt acctgggtct ggacgtgcca gtgtgaacca gaaggccaag 4020
 tccgcagaag ccctgatgtg tcctcagga gcagggaagg cctgacttct gctggcatca 4080
 agaggtggga gggccctccg accacttcca ggggaacctg ccatgccagg aacctgtcct 4140
 aaggaacctt ccttcctgct tgagtccca gatggctgga aggggtccag cctcgttggga 4200
 agaggaacag cactggggag tctttgtgga ttctgaggcc ctgcccaatg agactctagg 4260
 gtccagtgga tgccacagcc cagcttgcc ctttccttcc agatcctggg tactgaaagc 4320
 cttaggggaag ctggcctgag aggggaagcg gcctaaggg agtgtctaag aacaaaagcg 4380
 acccattcag agactgtccc tgaaacctag tactgcccc catgaggaag gaacagcaat 4440
 ggtgtcagta tccaggcttt gtacagagtg cttttctgtt tagtttttac ttttttgtt 4500
 ttgttttttt aaagatgaaa taaagaccca gggggagaat ggggtgtgta tggggaggca 4560
 agtgtggggg gtccttctcc acaccactt tgtccattg caaatatatt ttgaaaaca 4620
 gcta 4624

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Motivo de sulfatasa heterólogo

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = Cualquier aminoácido o puede estar ausente

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> C-alfa-formilglicina (FGly)

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = Ala o Pro

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

35 <400> 5

Xaa Gly Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Motivo de sulfatasa heterólogo

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido o puede estar ausente
 10

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Cys o Ser
 15

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 20

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = Pro o Ala
 25

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 30

 <400> 6
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 35
 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Enlazador peptídico

 <400> 7
 Gly Ser Gly Ser
 1
 45
 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Enlazador peptídico

 <400> 8
 Gly Gly Ser Gly
 1
 55
 <210> 9
 <211> 4

	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Enlazador peptídico	
	<400> 9	Gly Gly Gly Ser
		1
10	<210> 10	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Enlazador peptídico	
	<400> 10	Gly Gly Gly Gly Ser
		1 5
20	<210> 11	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Enlazador peptídico	
	<400> 11	Gly Asn Gly Asn
		1
30	<210> 12	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Enlazador peptídico	
	<400> 12	Gly Gly Asn Gly
		1
40	<210> 13	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Enlazador peptídico	
	<400> 13	Gly Gly Gly Asn
		1
50	<210> 14	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	

ES 2 582 869 T3

<223> Enlazador peptidico

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Asn
1 5

5

<210> 15

<211> 1210

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 15

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr

ES 2 582 869 T3

100 105 110
 Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115 120 125
 Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140
 His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160
 Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165 170 175
 Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
 180 185 190
 Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
 195 200 205
 Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
 210 215 220
 Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
 245 250 255
 Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
 260 265 270
 Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
 275 280 285
 Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 290 295 300
 Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
 325 330 335
 Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
 340 345 350

ES 2 582 869 T3

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
 355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
 370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
 385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
 405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
 420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
 435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
 465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
 500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
 530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
 595 600 605

ES 2 582 869 T3

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
 610 615 620
 Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
 625 630 635 640
 Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
 645 650 655
 Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
 660 665 670
 Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
 675 680 685
 Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
 690 695 700
 Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
 705 710 715 720
 Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
 725 730 735
 Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
 740 745 750
 Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
 755 760 765
 Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
 770 775 780
 Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
 785 790 795 800
 Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
 805 810 815
 Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
 820 825 830
 Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
 835 840 845
 Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
 850 855 860

ES 2 582 869 T3

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
 865 870 875 880
 Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
 885 890 895
 Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
 900 905 910
 Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
 915 920 925
 Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
 930 935 940
 Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
 945 950 955 960
 Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
 965 970 975
 Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
 980 985 990
 Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
 995 1000 1005
 Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
 1010 1015 1020
 Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
 1025 1030 1035
 Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn
 1040 1045 1050
 Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
 1055 1060 1065
 Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
 1070 1075 1080
 Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro
 1085 1090 1095
 Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln

ES 2 582 869 T3

1100		1105		1110
Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro				
1115		1120		1125
His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln				
1130		1135		1140
Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala				
1145		1150		1155
Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln				
1160		1165		1170
Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys				
1175		1180		1185
Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln				
1190		1195		1200
Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala				
1205		1210		

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un polipéptido p97 unido covalentemente u operativamente a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína Her2/neu humana, en el que el polipéptido p97 es eficaz para transportar el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo a través de la barrera hematoencefálica.
2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido p97 comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con los residuos 20-711 de la SEQ ID NO: 1.
3. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido p97 comprende un fragmento de una secuencia de proteína p97 humana que tiene al menos 100 residuos aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1.
4. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido p97 es un polipéptido p97 humano soluble, preferiblemente en el que el polipéptido p97 humano soluble comprende los residuos 20-711 de la SEQ ID NO: 1.
5. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido p97 y el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno están unidos covalentemente como un polipéptido de fusión.
6. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido p97 está unido covalentemente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno con un enlazador.
7. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido p97 (a) está unido covalentemente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno con un reticulador polimérico, (b) está unido covalentemente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno a través de una nanopartícula, o (c) está unido operativamente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo a través de un liposoma.
8. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido p97 está unido covalentemente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno con un reticulador polimérico que comprende un enlace tioéter.
9. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido p97 está unido covalentemente al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno con un reticulador polimérico que comprende polietilenglicol.
10. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo es trastuzumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
11. Una composición para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa Her2/neu que comprende un conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, preferiblemente en la que el cáncer que expresa Her2/neu es un cáncer primario del sistema nervioso central (SNC), opcionalmente el cerebro.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el cáncer primario del SNC se selecciona entre glioma (por ejemplo, astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma, un papiloma del plexo coroideo), meningioma, adenoma en la pituitaria, neurinoma del acústico, linfoma primario del SNC y tumor neuroectodérmico primitivo (meduloblastoma), o en la que el cáncer primario del SNC es glioblastoma multiforme, opcionalmente un glioblastoma de células gigantes o gliosarcoma.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el cáncer que expresa Her2/neu es un cáncer metastásico del sistema nervioso central (SNC), opcionalmente el cerebro.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el cáncer metastásico metastatózó al SNC de un cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del tracto genitourinario, cánceres del tracto gastrointestinal (por ejemplo, cáncer colorrectal, carcinoma pancreático), osteosarcoma, melanomas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma prostático), o cáncer hematopoyético.
15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el cáncer que expresa Her2/neu es un cáncer de mama.

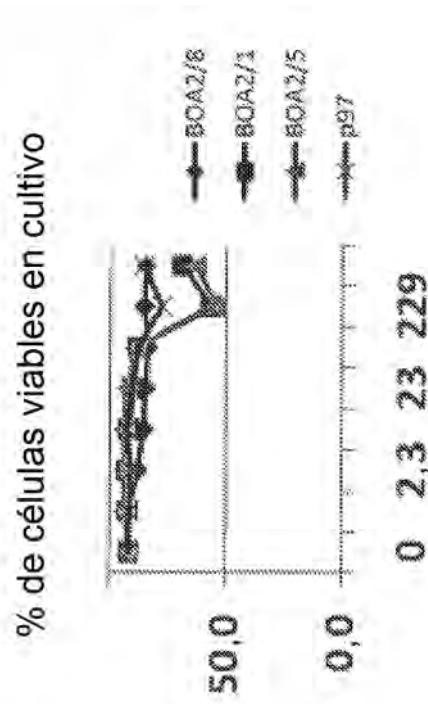


FIG. 1B

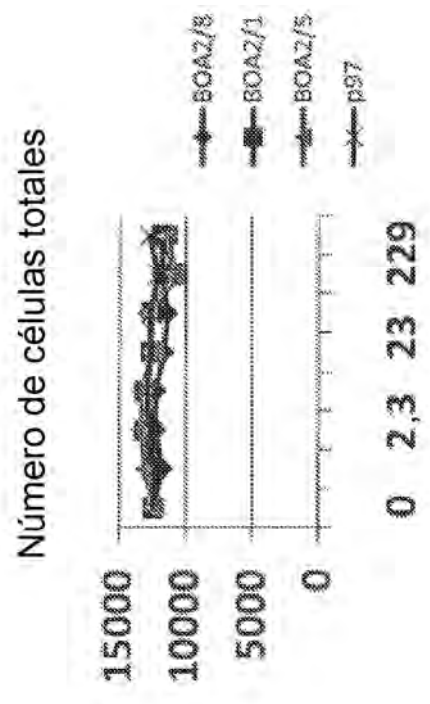


FIG. 1D

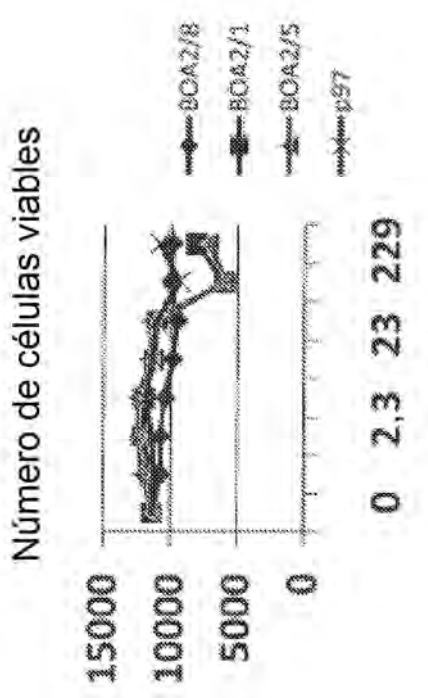


FIG. 1A

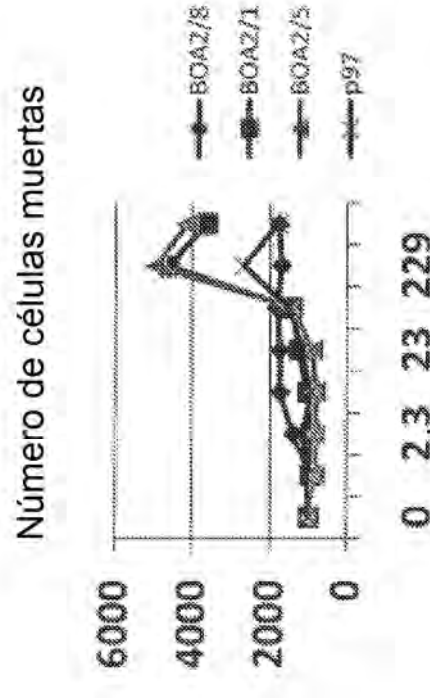


FIG. 1C

LÍNEA CELULAR: BT474

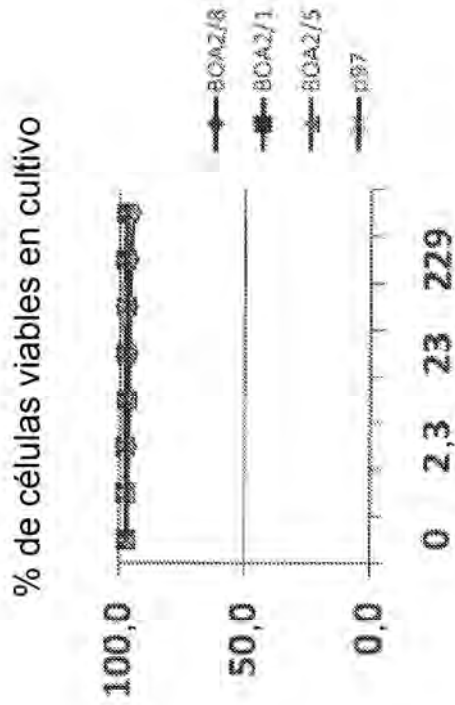


FIG. 2B

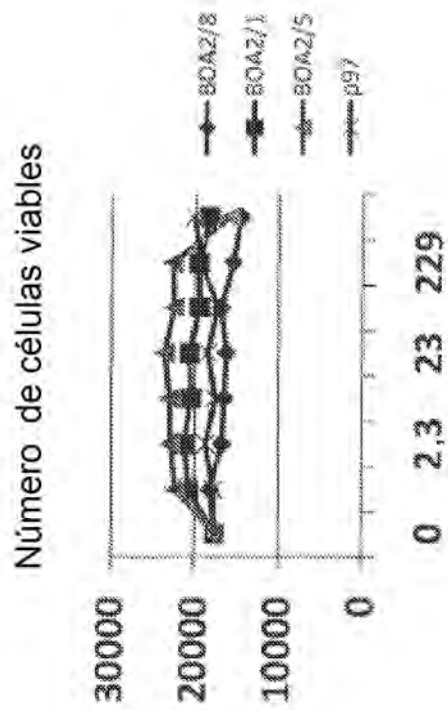


FIG. 2A

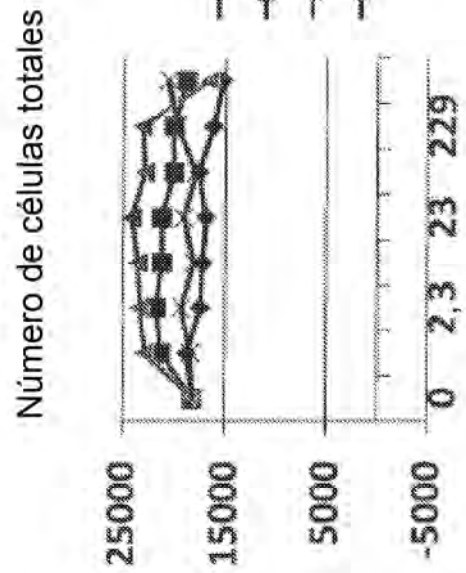


FIG. 2D

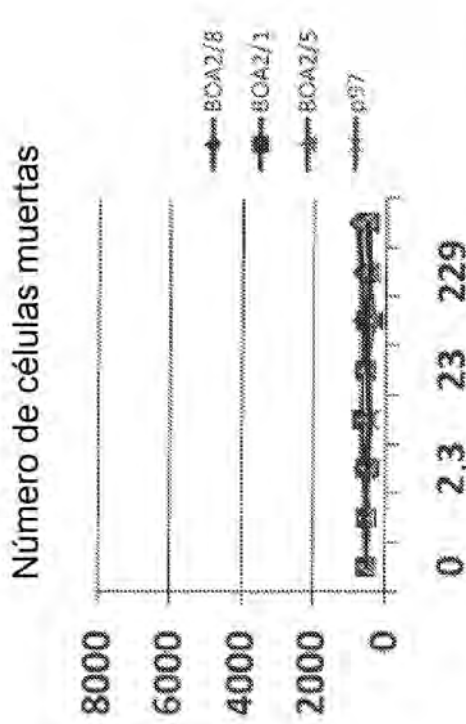
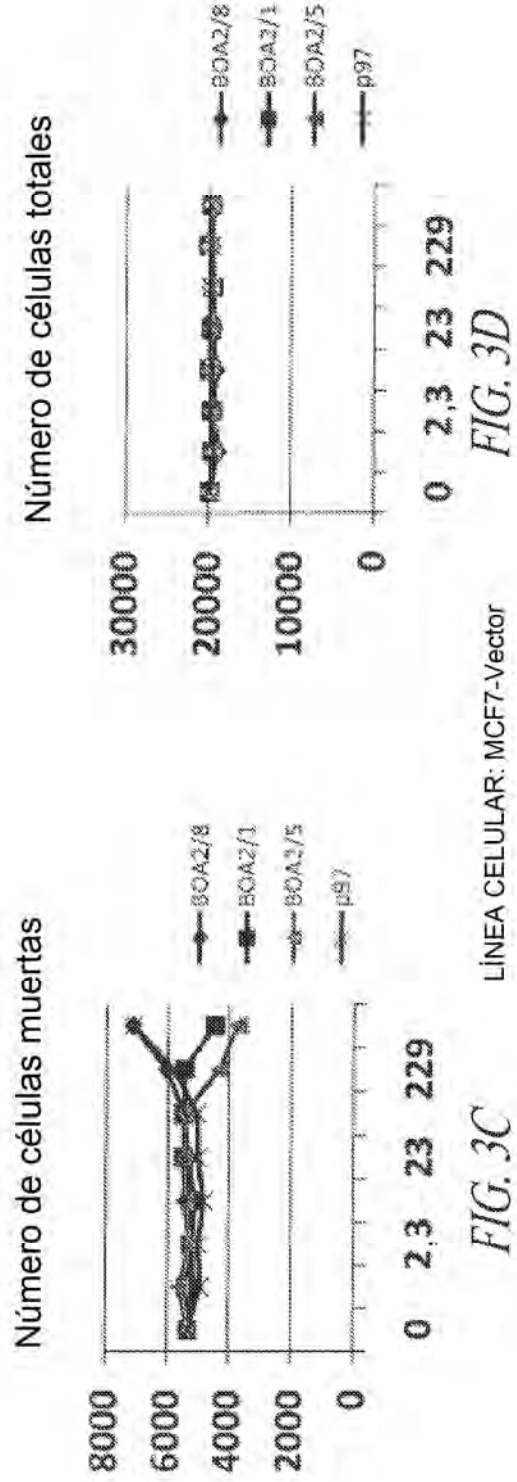
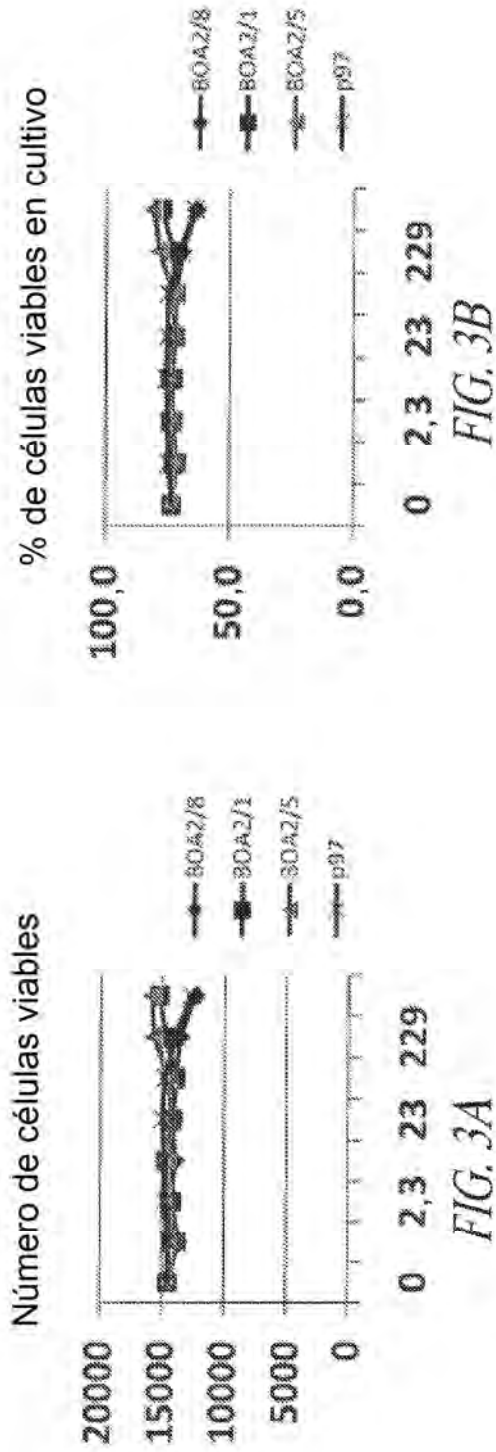


FIG. 2C

LÍNEA CELULAR: MCF7-HER2



LÍNEA CELULAR: MCF7-Vector

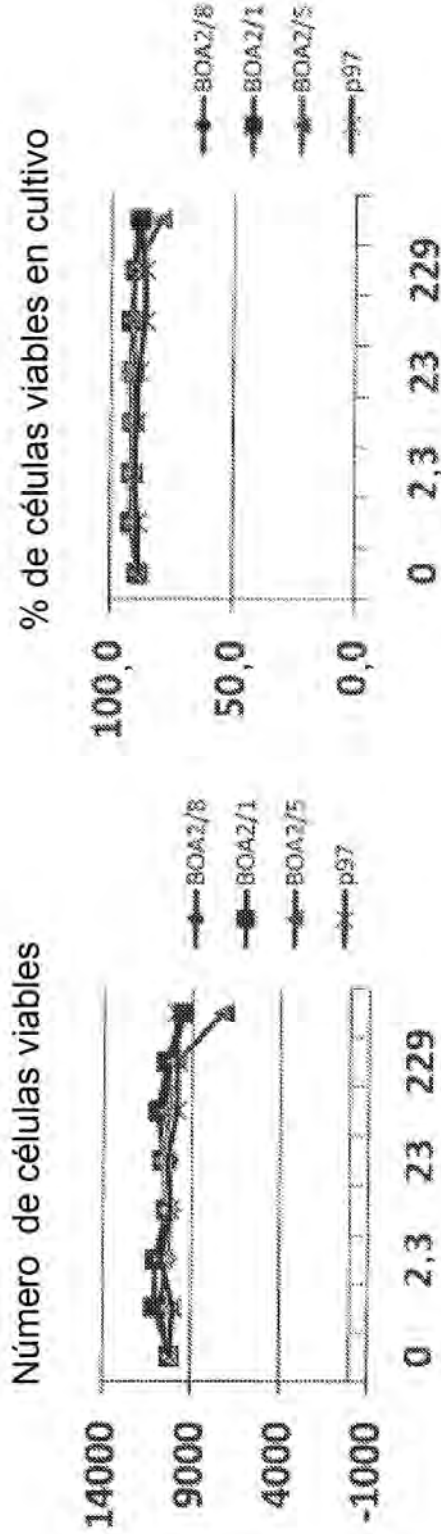


FIG. 4A

FIG. 4B

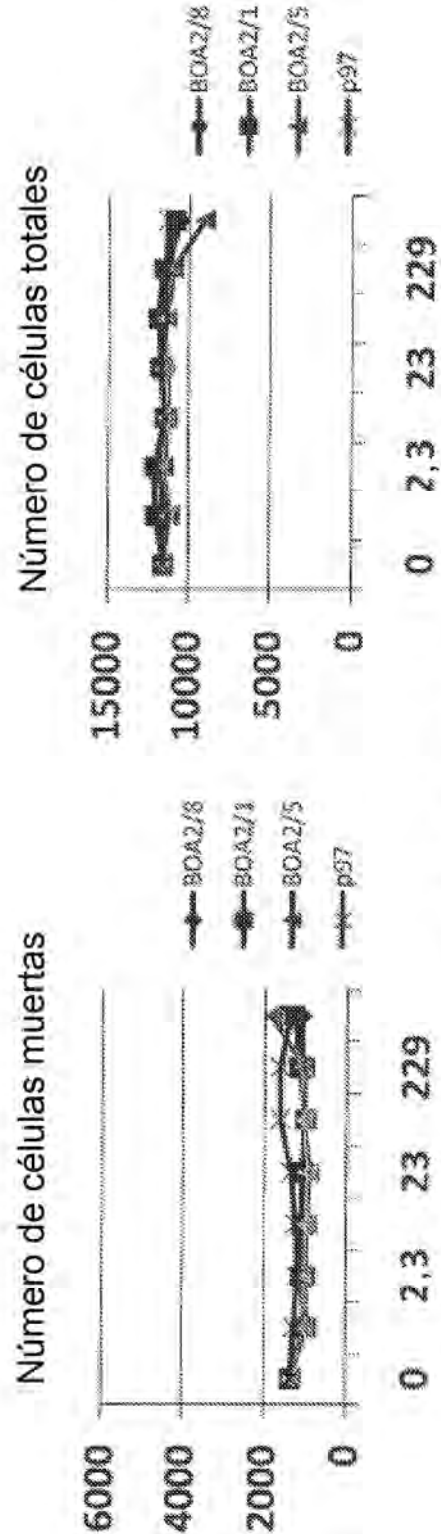


FIG. 4C

FIG. 4D

LÍNEA CELULAR: SKBR3

Biodistribución cerebral de BT2111 normalizado a la dosis inyectada

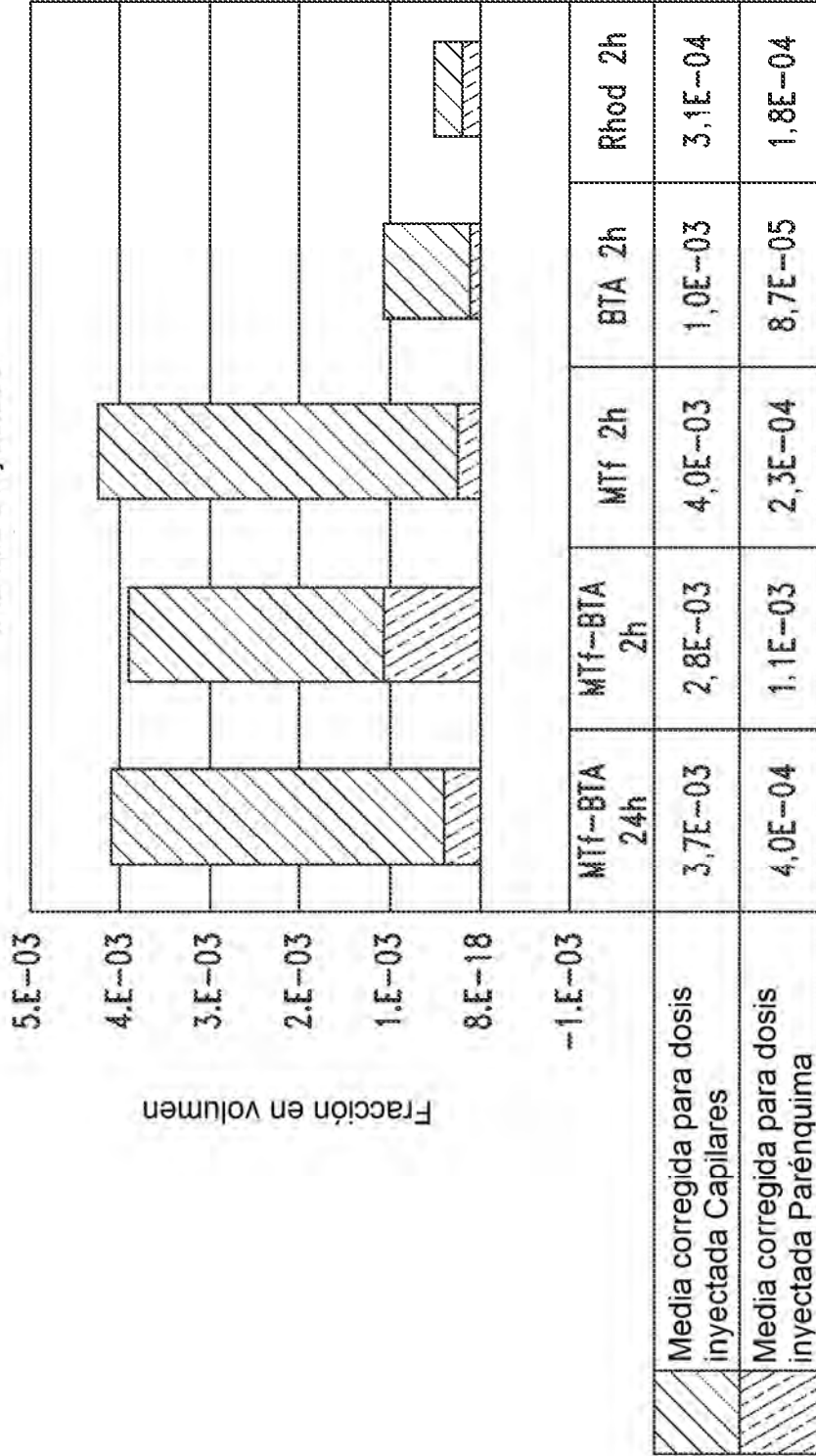


FIG. 5A

Biodistribución cerebral de BT2111 Normalizada a fluorescencia

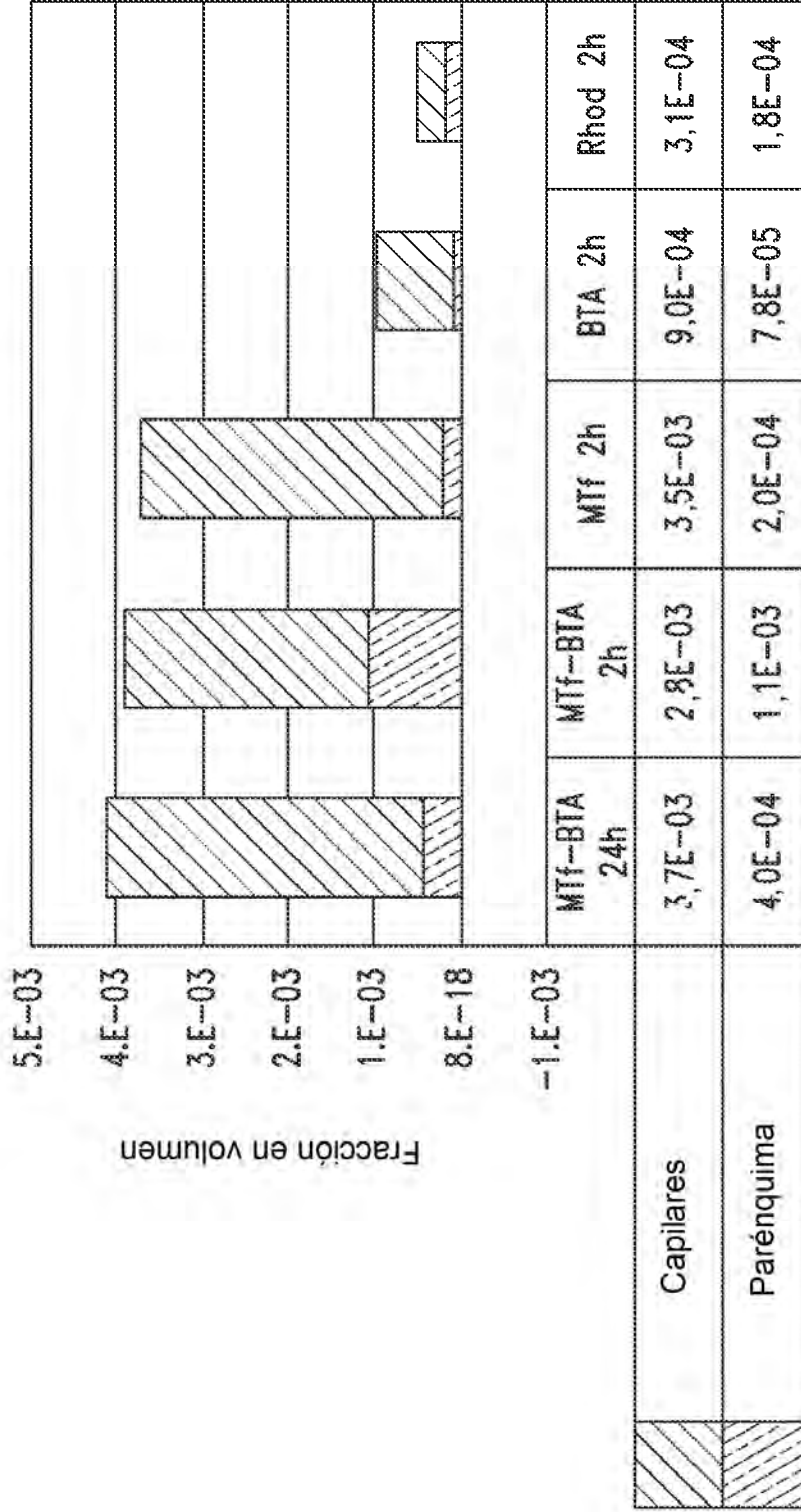


FIG. 5B

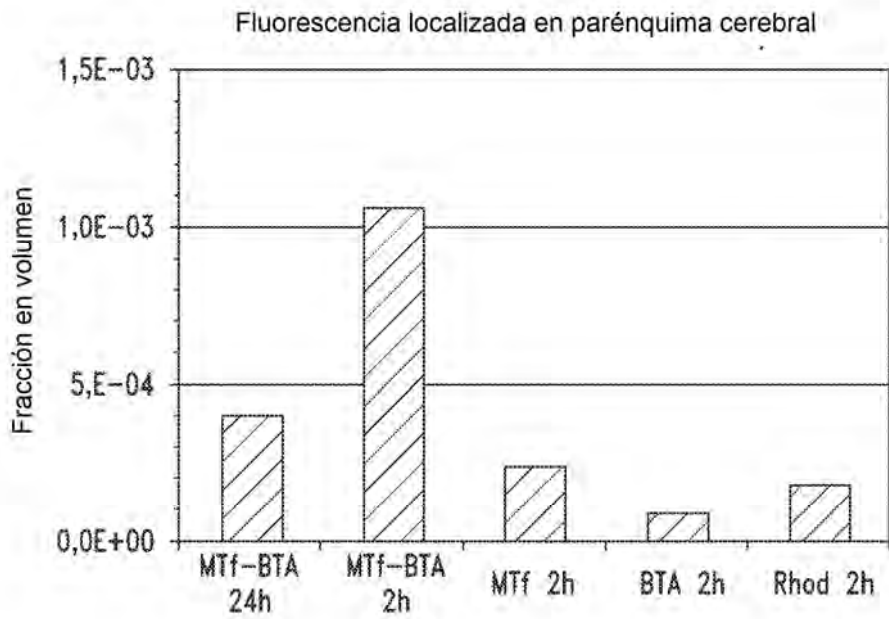


FIG. 5C

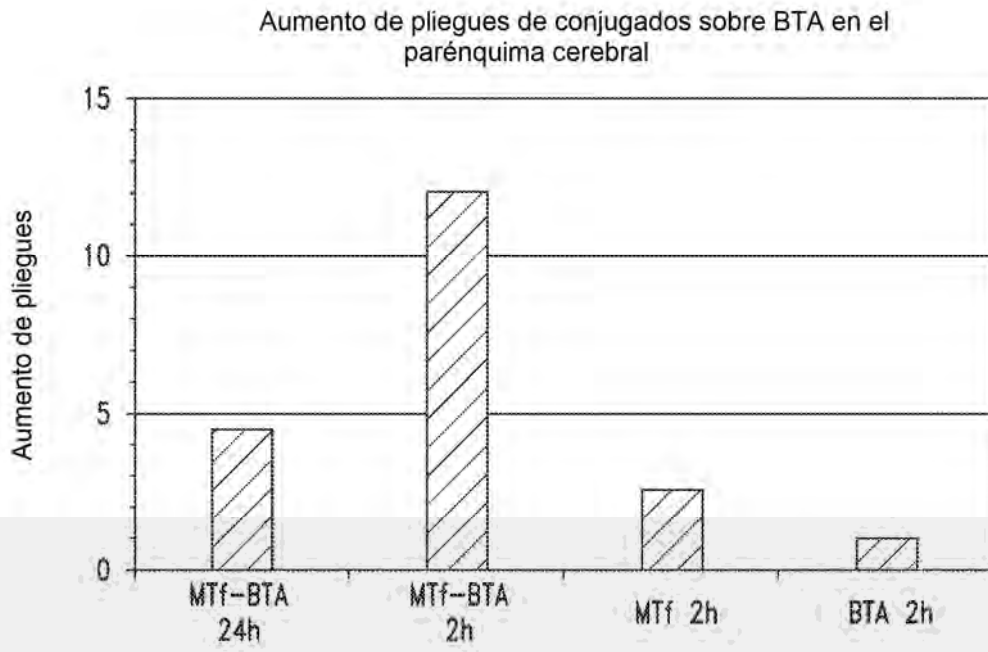


FIG. 5D

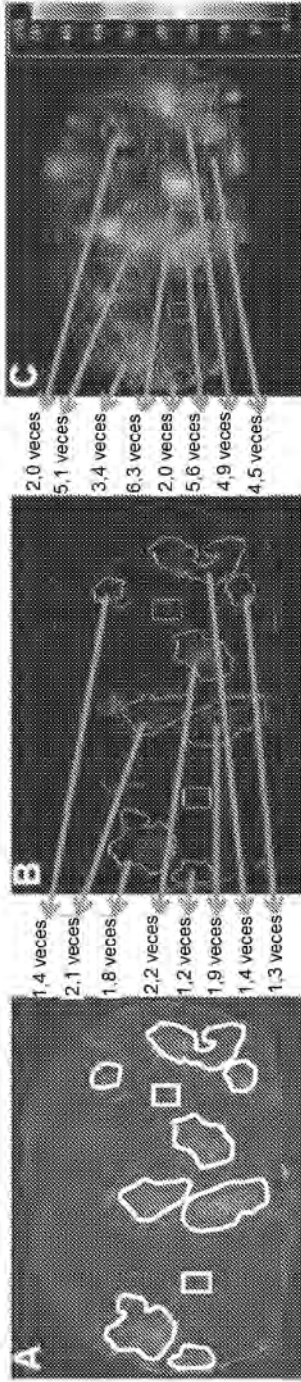


FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6C

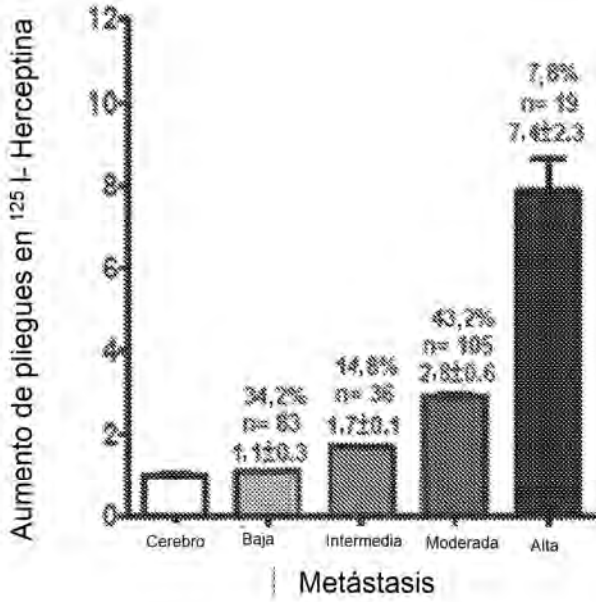


FIG. 6D

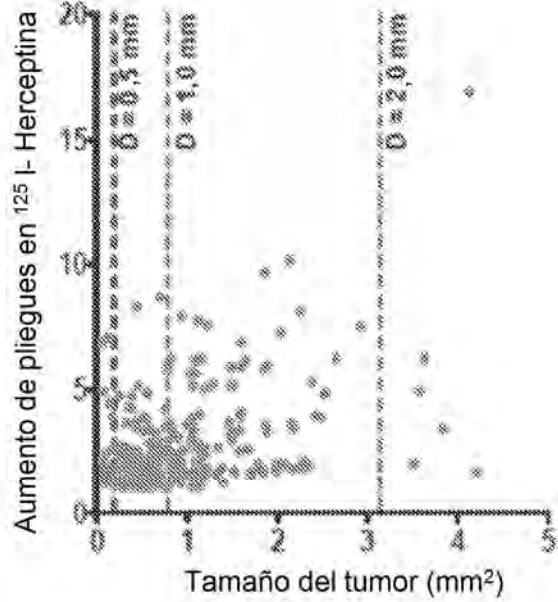


FIG. 6E

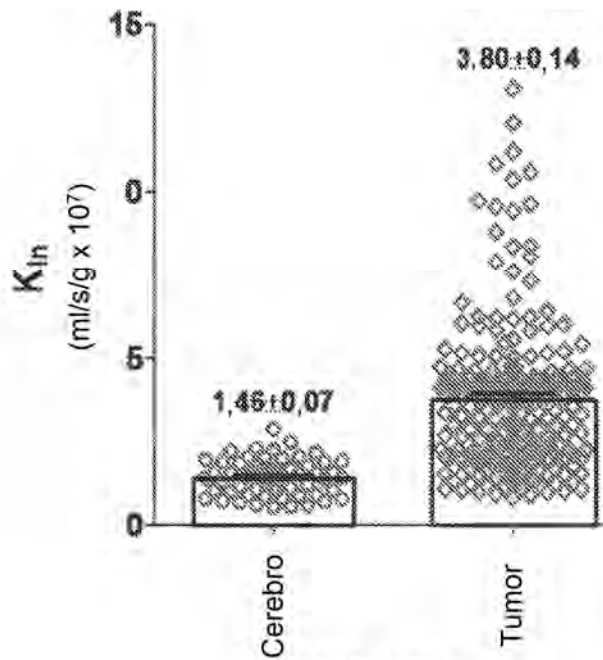


FIG. 6F

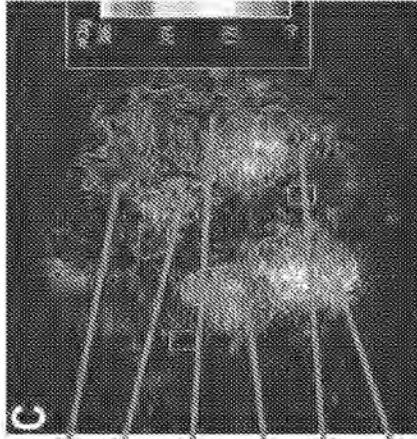


FIG. 7C

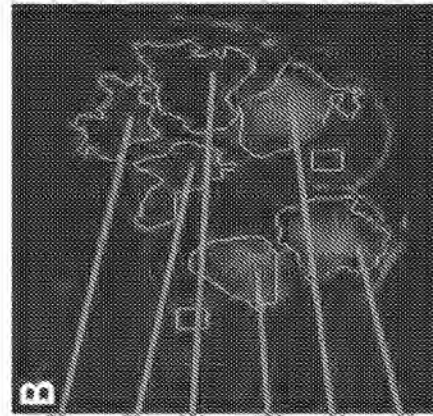


FIG. 7B

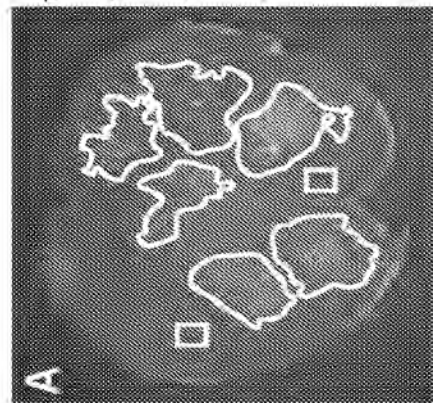


FIG. 7A

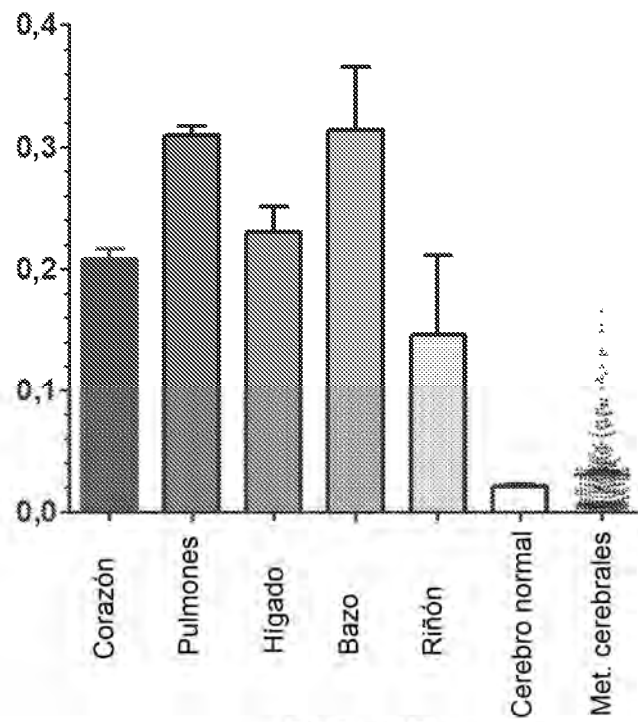


FIG. 7D

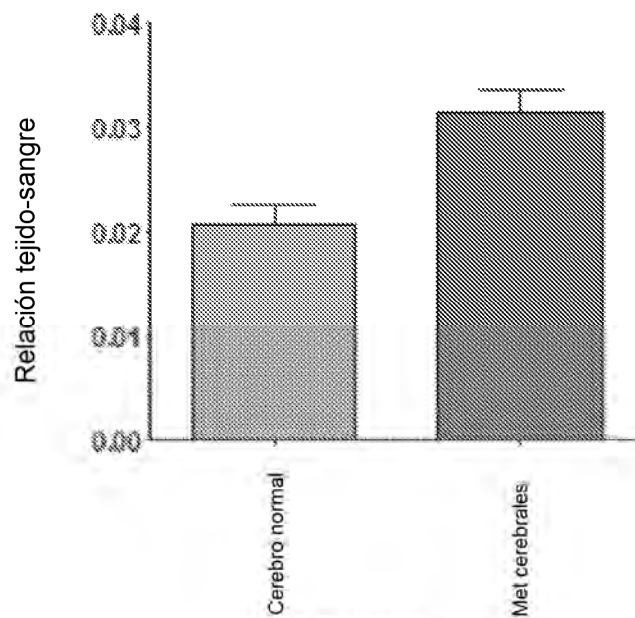


FIG. 7E

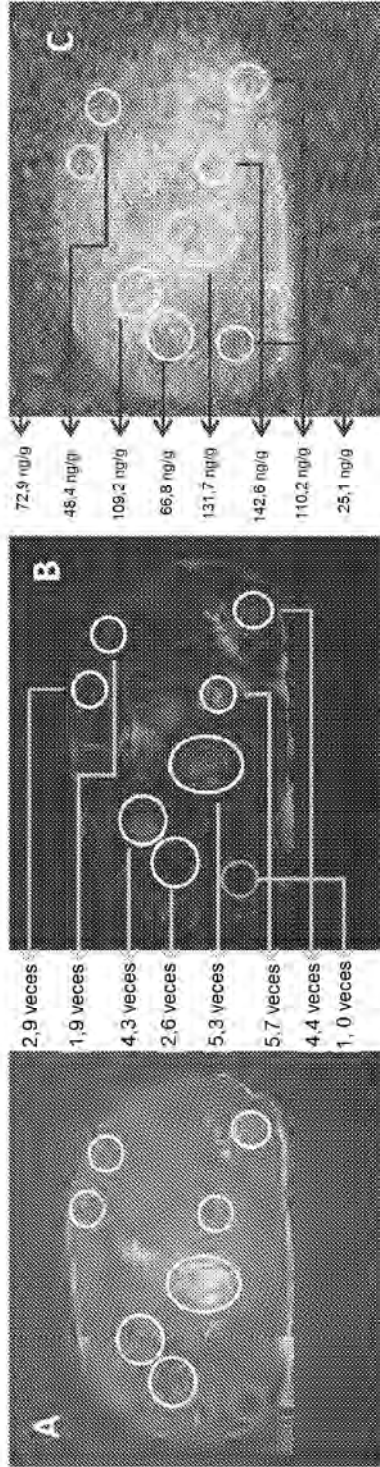


FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 8C

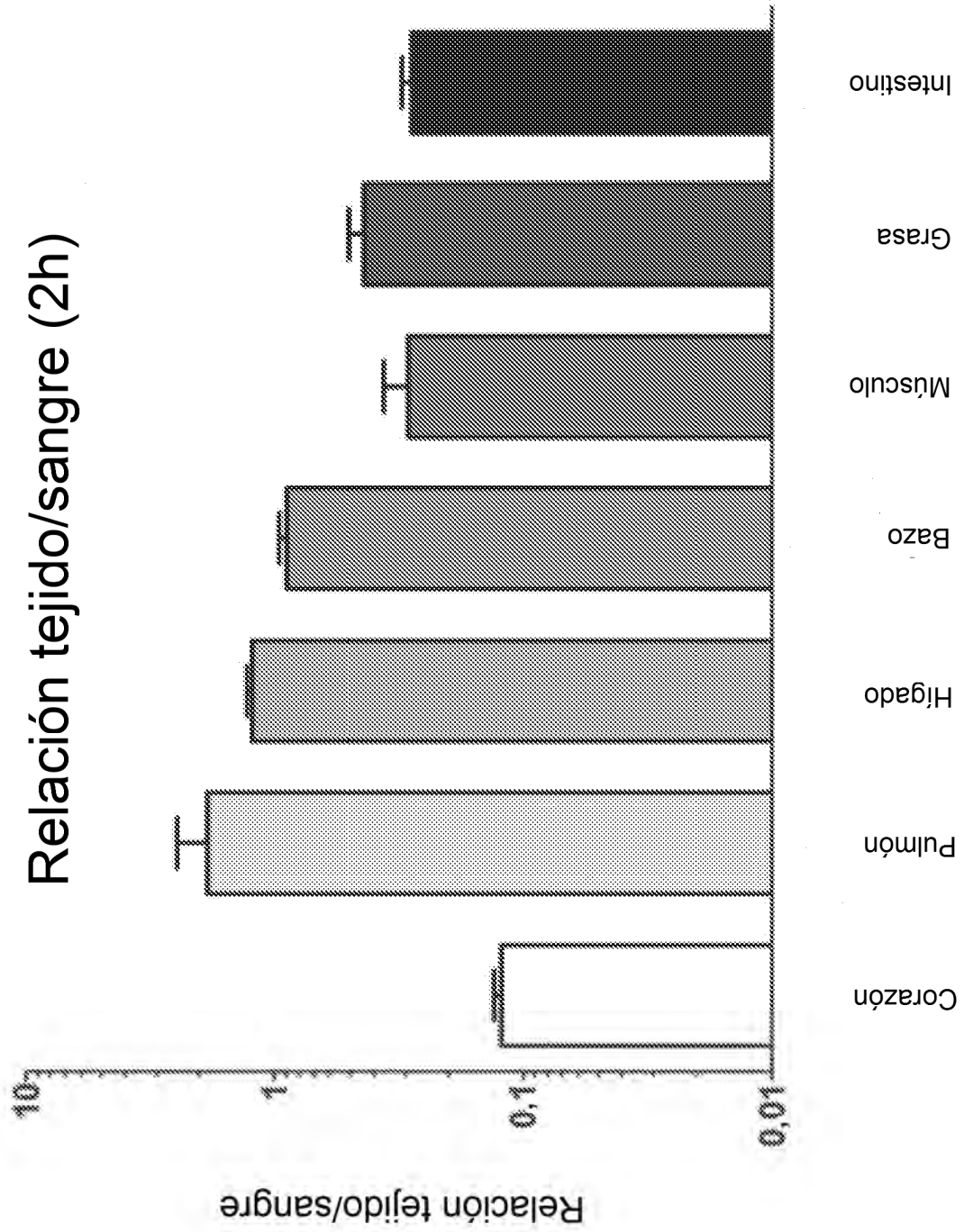


FIG. 8D

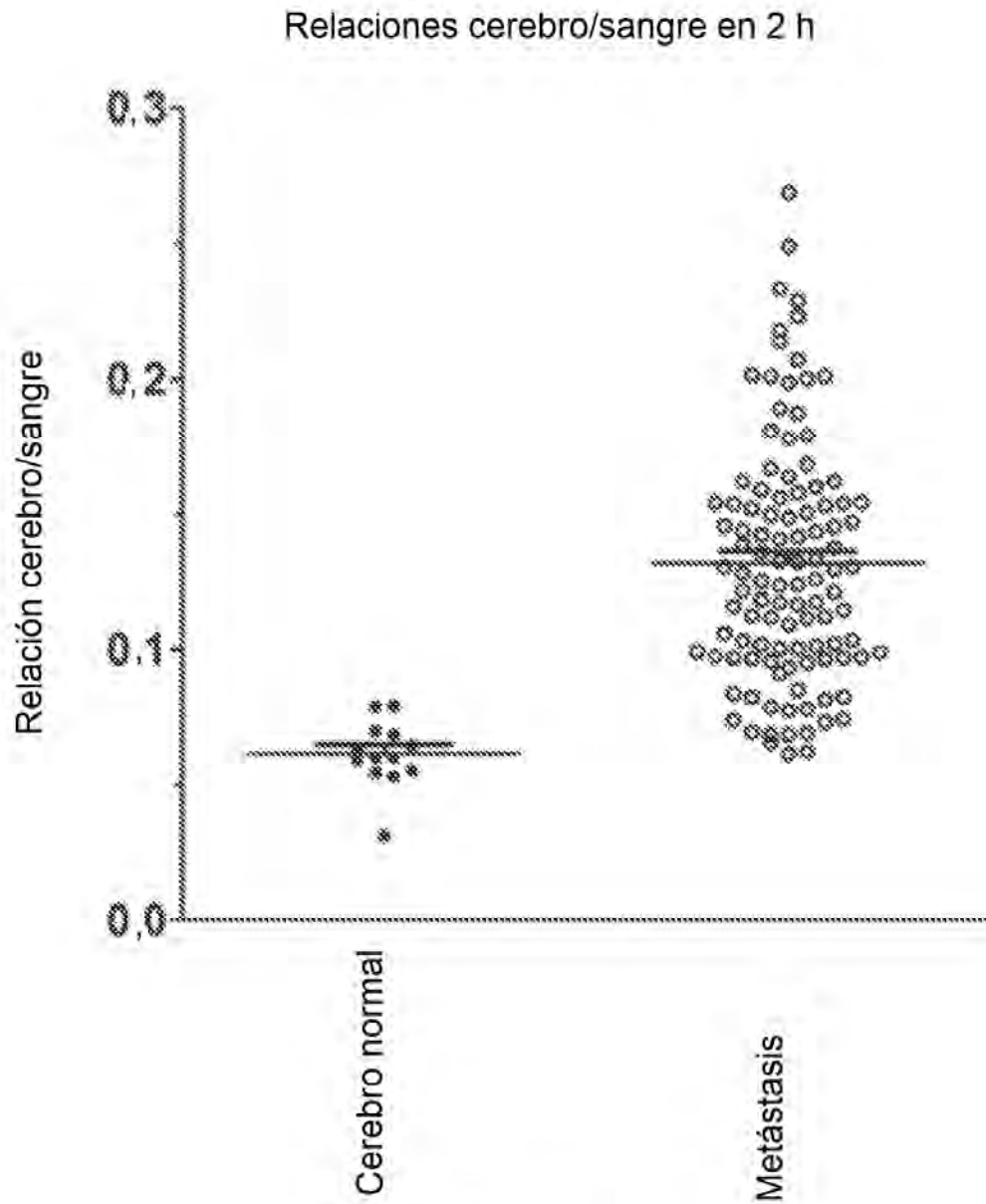


FIG. 8E

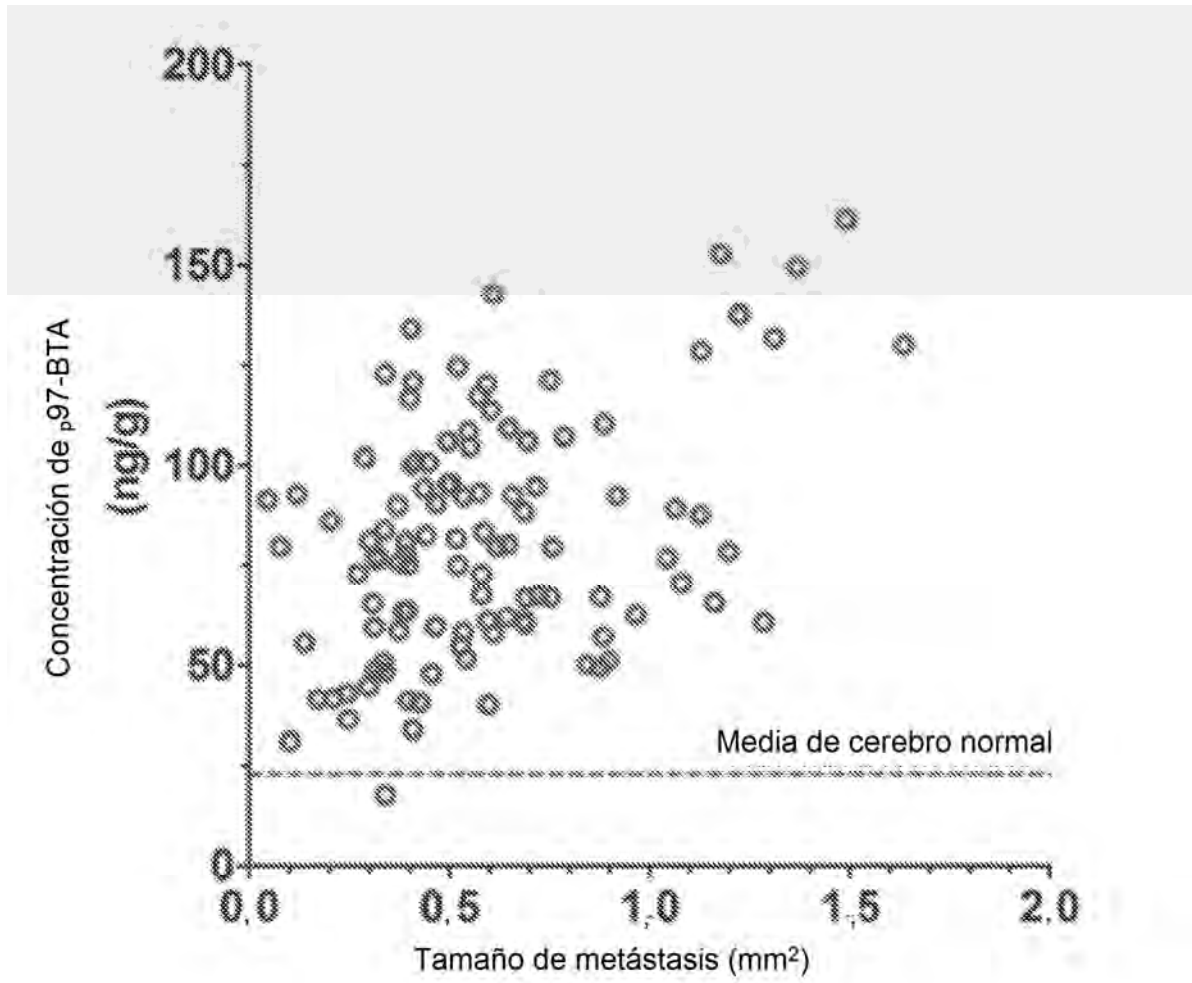


FIG. 8F

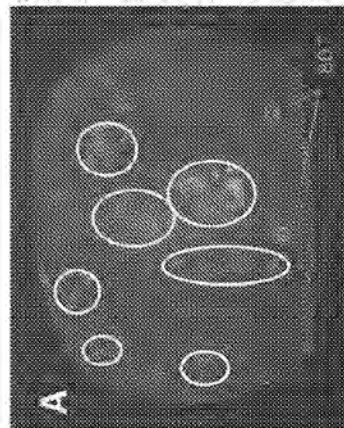


FIG. 9A

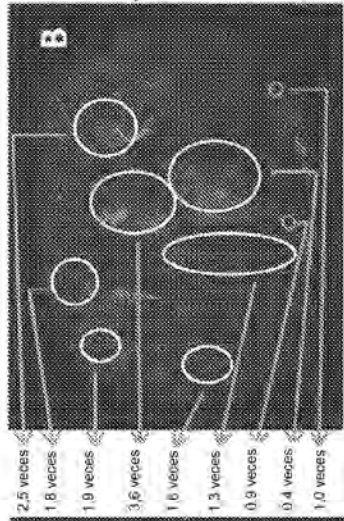


FIG. 9B

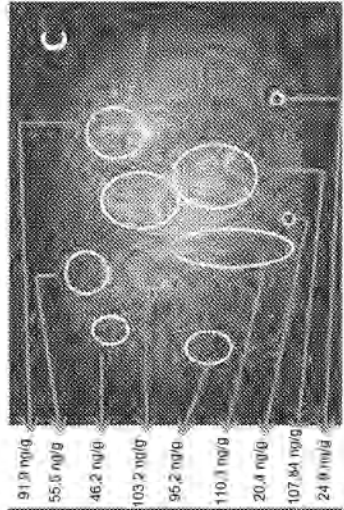


FIG. 9C

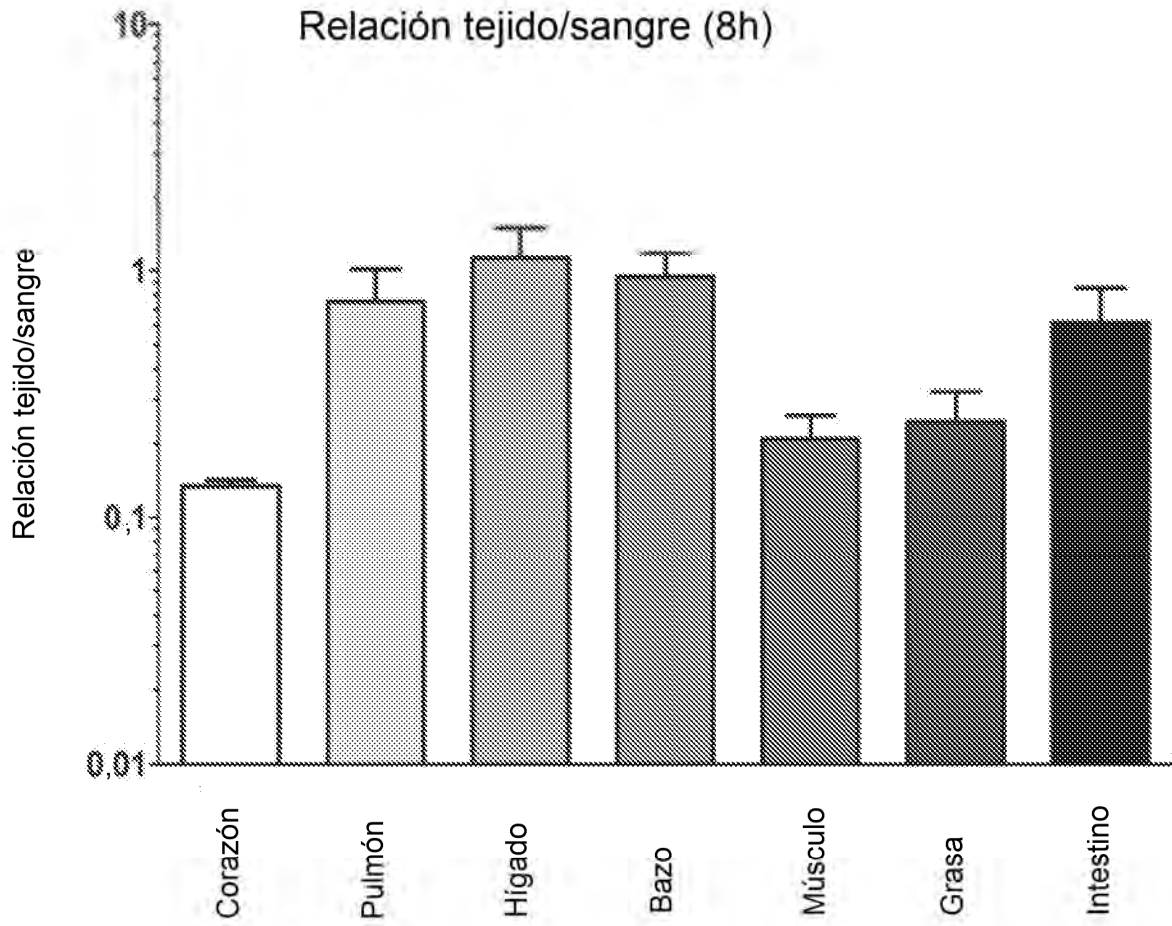


FIG. 9D

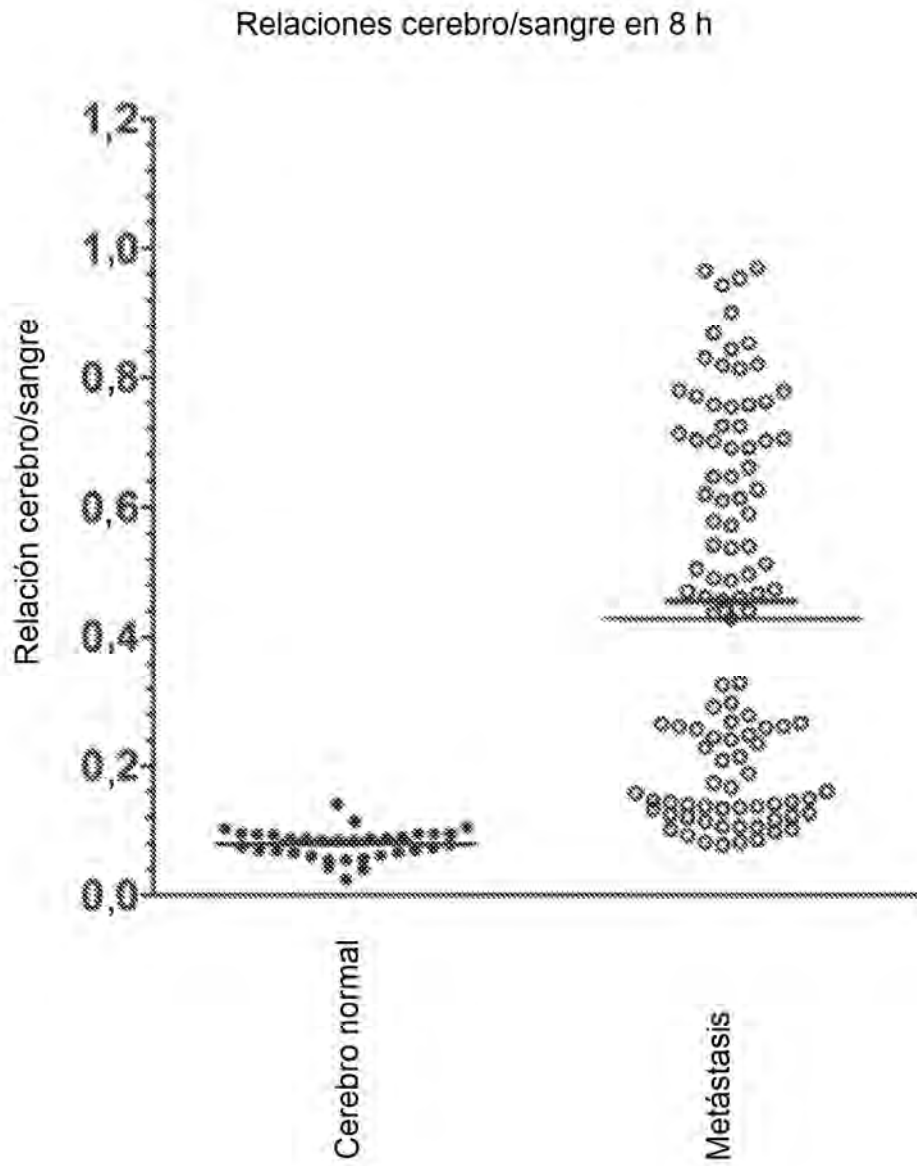


FIG. 9E

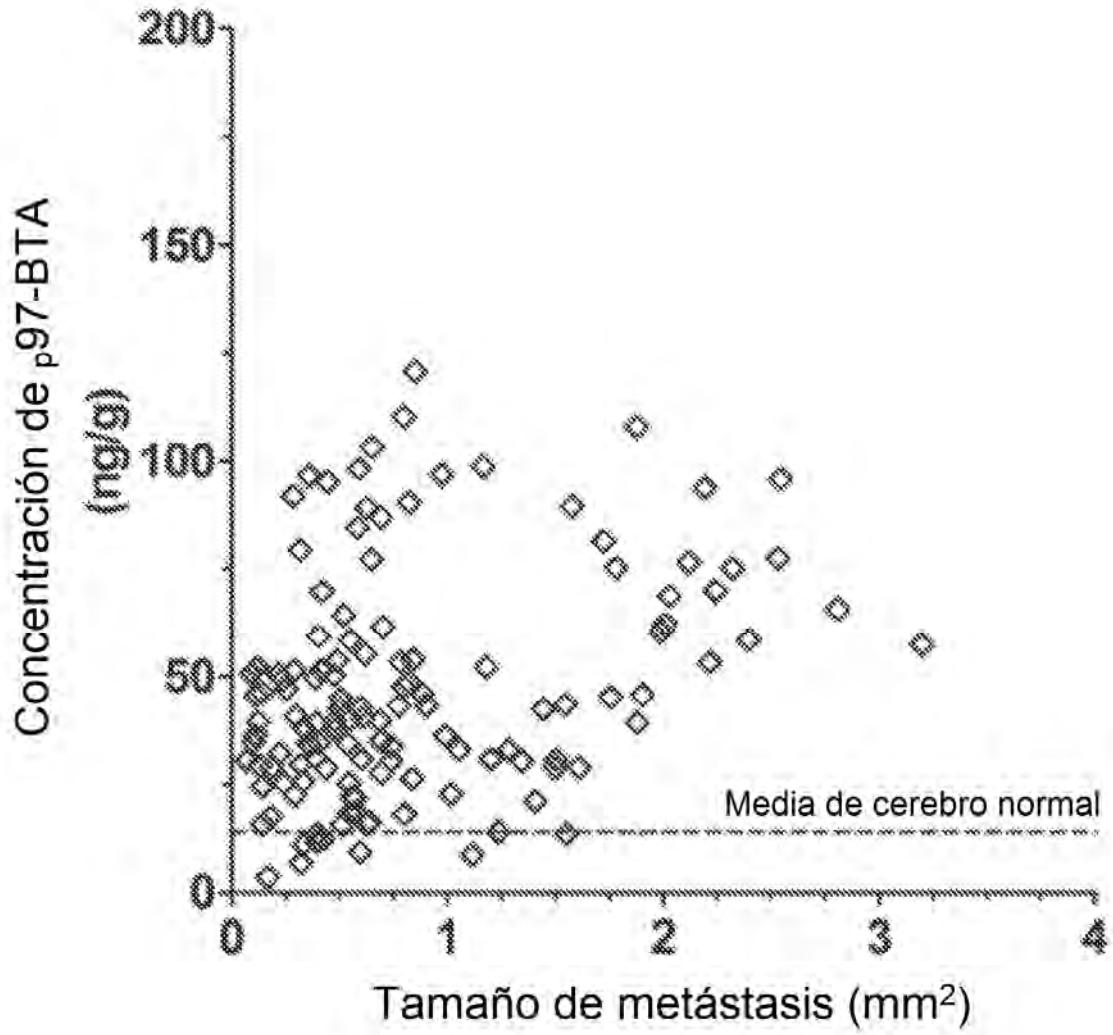


FIG. 9F

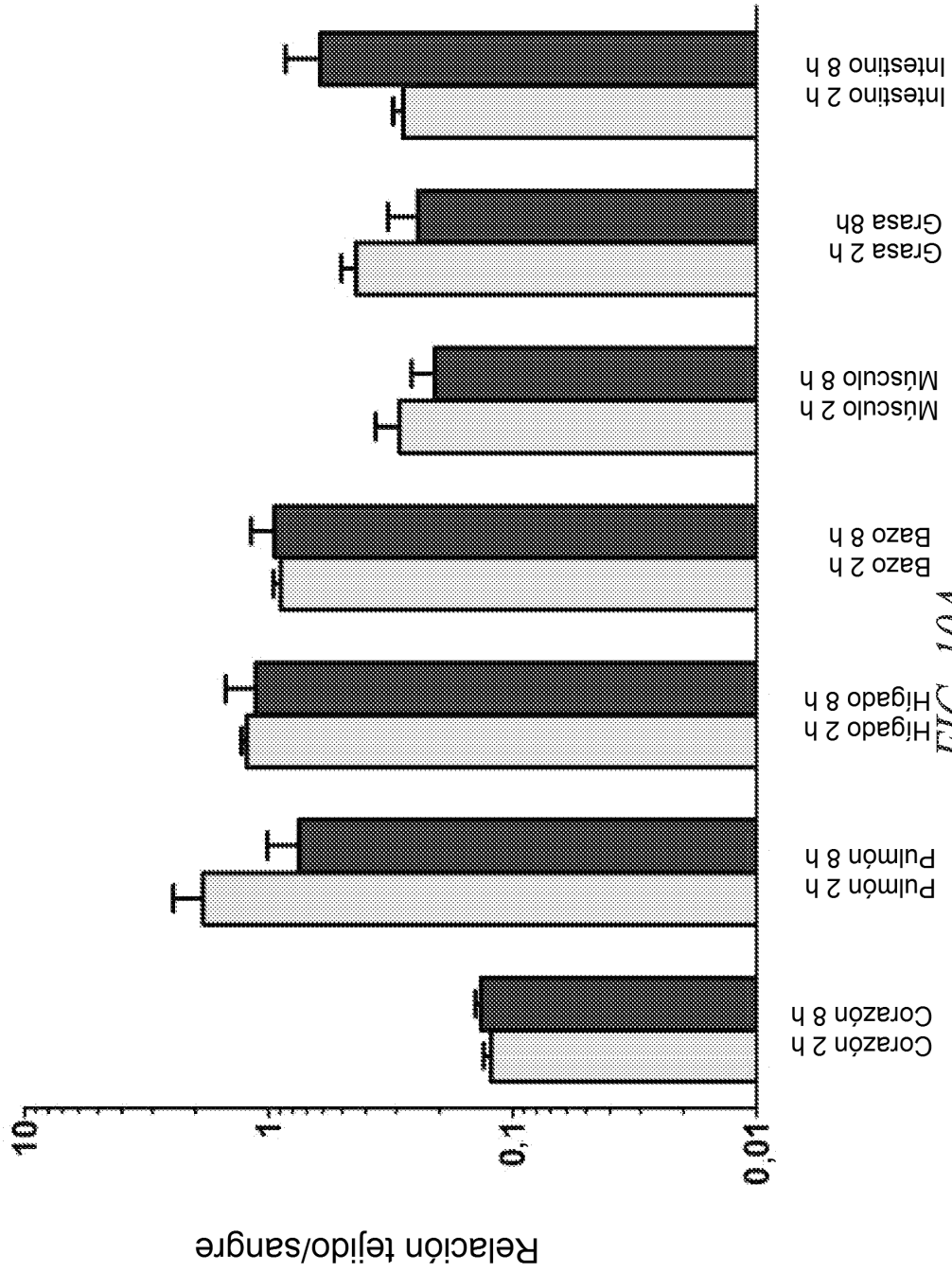


FIG. 10A

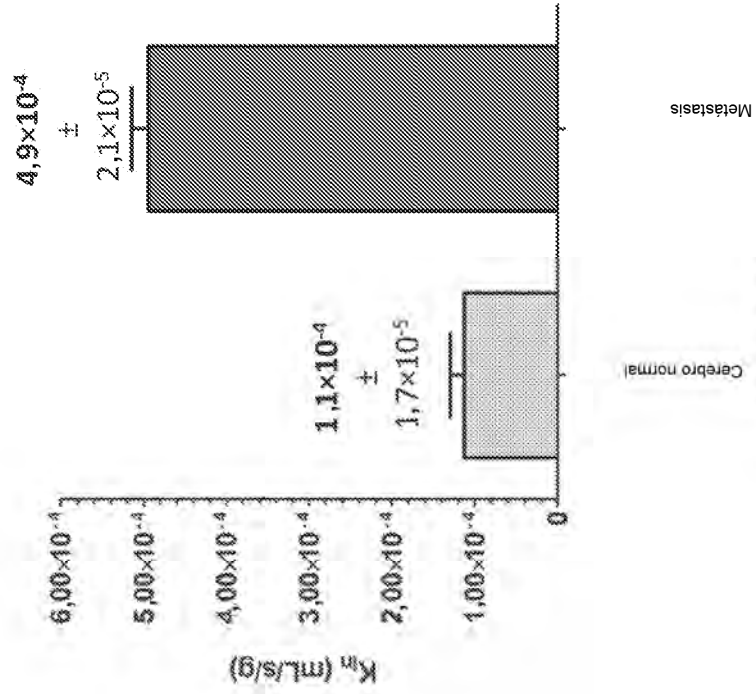


FIG. 10C

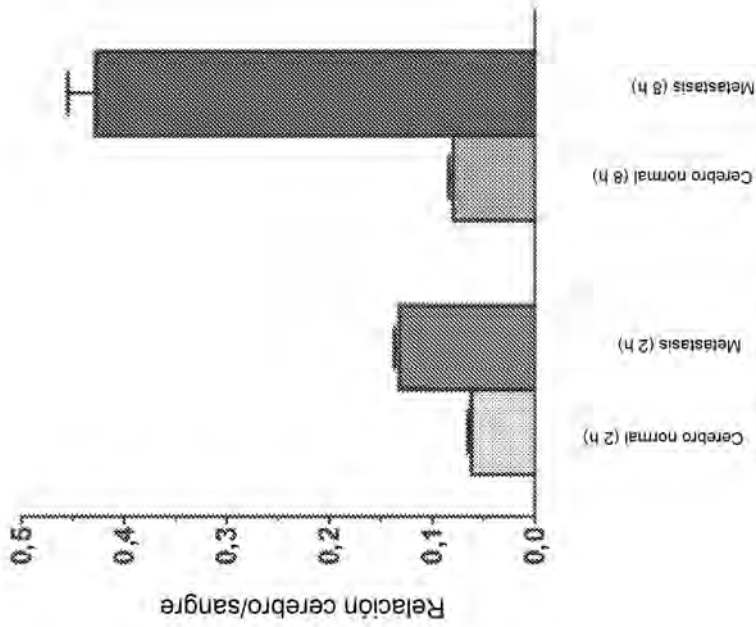


FIG. 10B

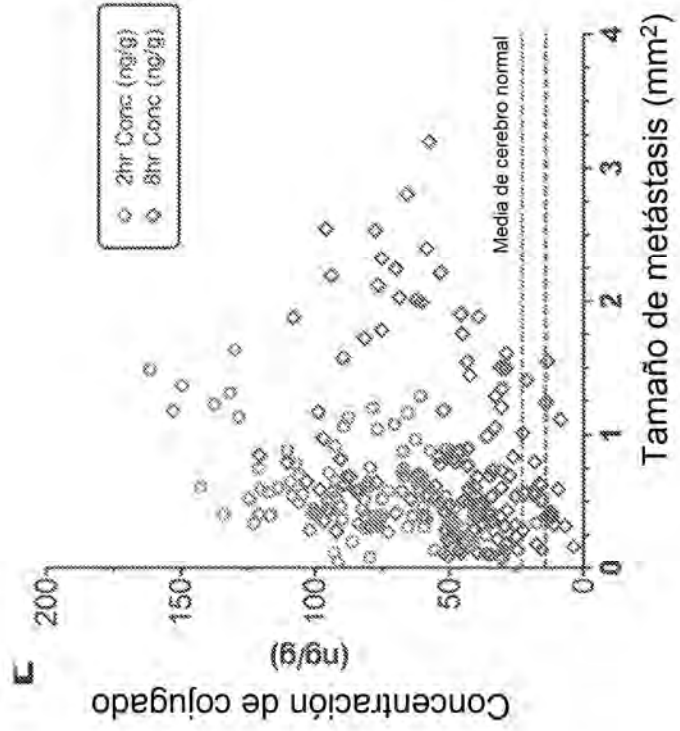


FIG. 10E

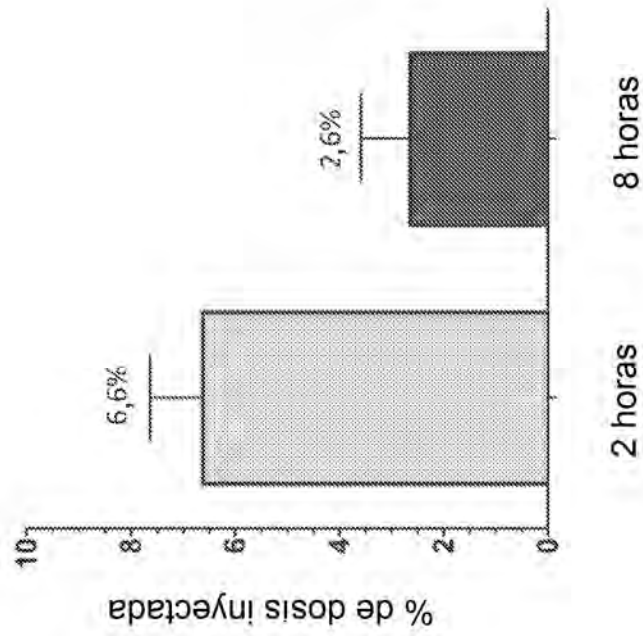


FIG. 10D

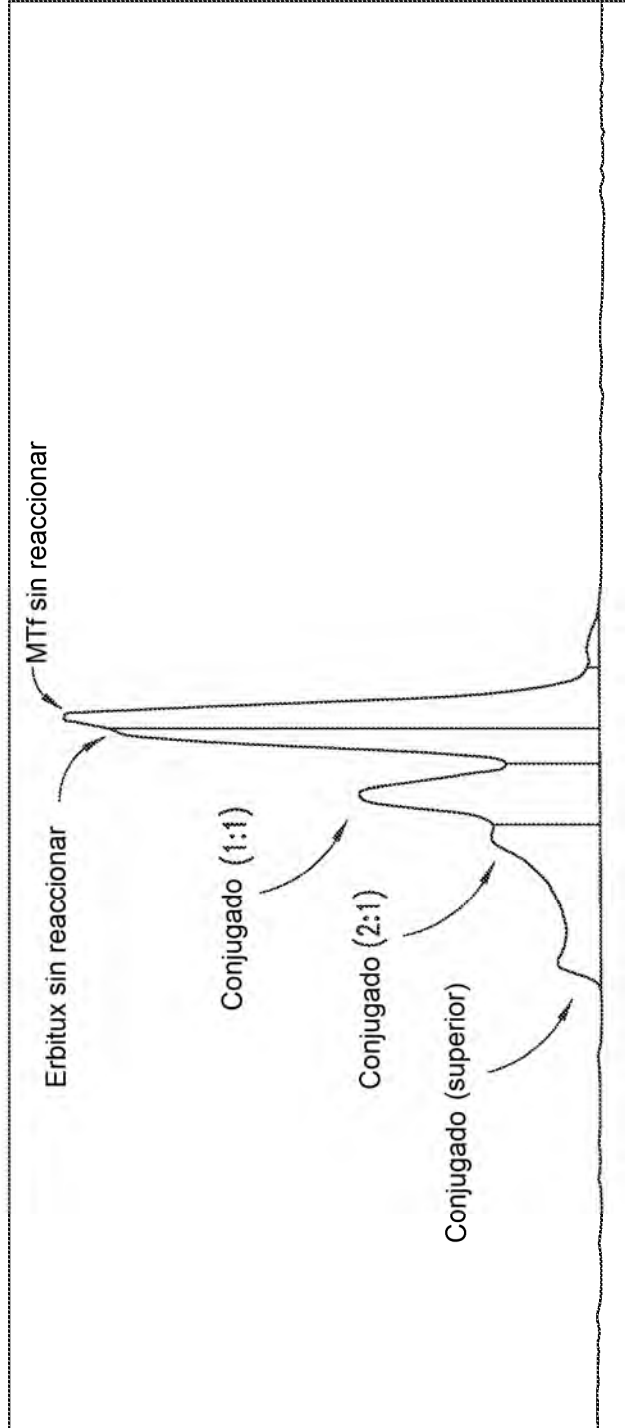


FIG. 11A

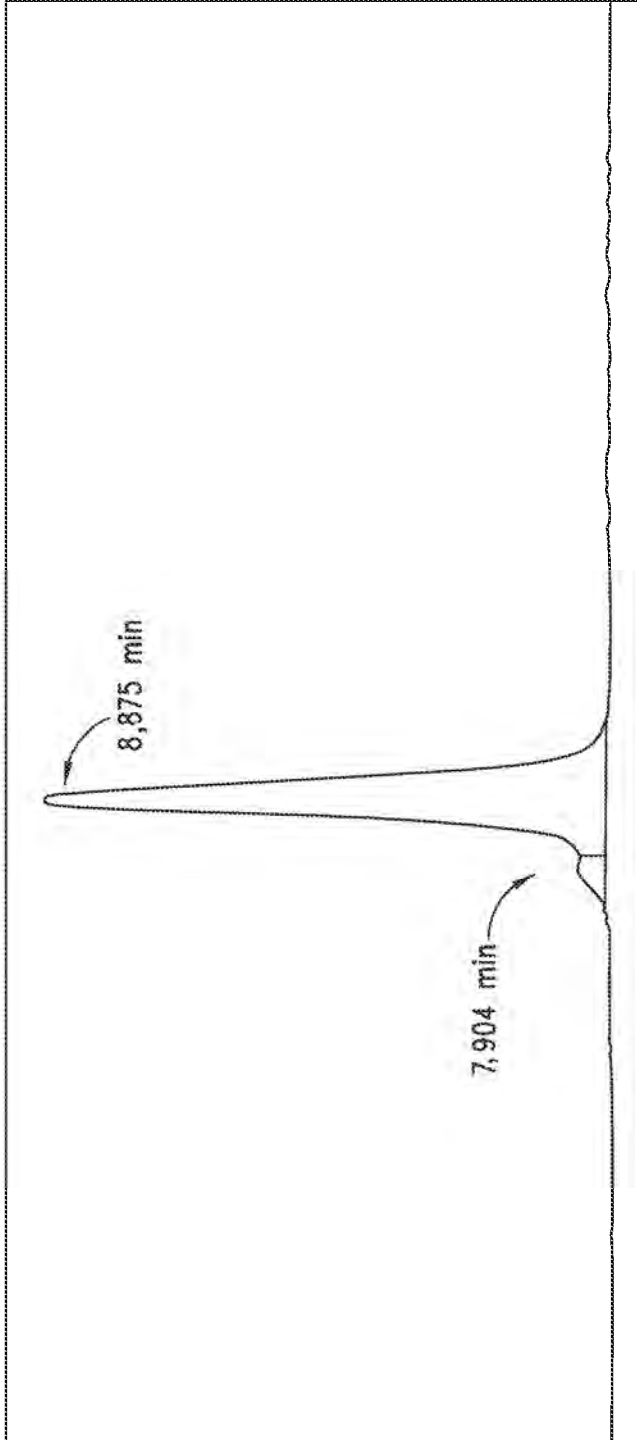


FIG. 11B

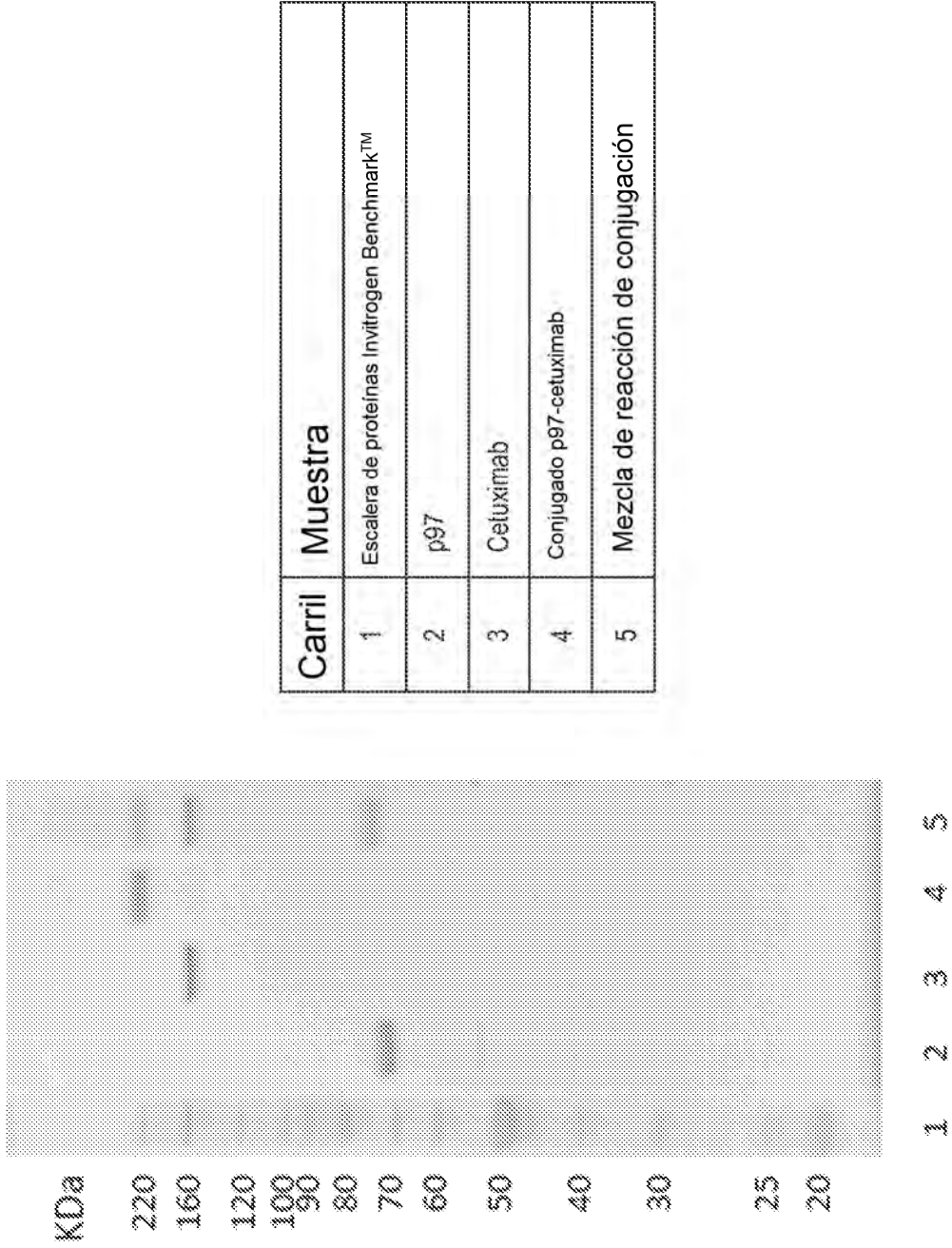


FIG. 12