

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 844**

51 Int. Cl.:

A61K 31/675 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2009 PCT/US2009/041276**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2009 WO2009132020**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2009 E 09734156 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2268654**

54 Título: **Ligandos polidentados de alta afinidad selectivos y métodos para producirlos**

30 Prioridad:

21.04.2008 US 46712 P

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

26.05.2017

73 Titular/es:

**LAWRENCE LIVERMORE NATIONAL SECURITY, LLC (50.0%)
2300 First Street, Suite 204
Livermore, CA 94550, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DENARDO, SALLY, J.;
DENARDO, GERALD, L. y
BALHORN, RODNEY, L.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 613 844 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

Ligandos polidentados de alta afinidad selectivos y métodos para producirlos

Declaración relativa a los derechos de las invenciones realizadas por actividades de investigación y desarrollo promovidas por el gobierno federal

- 5 Este trabajo ha sido financiado parcialmente a través de la subvención n° CA047829 del National Institutes of Health, National Cancer Institute (EE.UU.). Asimismo, de conformidad con el Contrato n° DE-AC52- 07NA27344 entre el Departamento de Energía de los Estados Unidos y Lawrence Livermore National Security LLC relativo al funcionamiento de Lawrence Livermore National Laboratory, el Gobierno de los Estados Unidos de América ostenta determinados derechos sobre esta invención.

10 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al desarrollo de moléculas diana. Más concretamente, esta invención se refiere al desarrollo de ligandos de alta afinidad selectivos polidentados (SHAL) que pueden ser utilizados de manera análoga a los anticuerpos y/o ligandos peptídicos como reactivos de afinidad o para el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades (como el cáncer).

15 **Antecedentes de la invención**

- En general, se ha descubierto que los fármacos cancericidas, como los quimioterapéuticos, también son tóxicos para las células de los tejidos normales. Por consiguiente, los efectos secundarios de estos fármacos pueden ser casi tan devastadores para el paciente como la propia enfermedad maligna. El descubrimiento de anticuerpos monoclonales y ligandos peptídicos proporcionó un nuevo método para mejorar la especificidad/selectividad de los fármacos. Al conjugar, por ejemplo, un agente citotóxico con un anticuerpo o ligando peptídico dirigido contra los antígenos presentes en las células malignas, pero no presentes en las células normales, se ha logrado la muerte selectiva de las células malignas. Se han creado numerosos inmunoconjugados diferentes que constan de un anticuerpo unido a un agente citotóxico dirigido contra diversos antígenos de la superficie celular.

- 20 Los agentes citotóxicos utilizados en estos inmunoconjugados incluyen radioisótopos, diversas toxinas de plantas y bacterianas (como, *Pseudomonas exotoxin*, toxina diftérica, ricina, abrina, etc.), diversos factores de crecimiento y más recientemente agentes como las caspasas. A pesar de que se han documentado algunos éxitos, en particular en el linfoma y las leucemias, por lo general las terapias basadas en anticuerpos, tanto las que usan anticuerpos solamente como las que utilizan inmunoconjugados, no han desarrollado el potencial previsto.

- 25 A pesar de que se han conseguido avances significativos en el tratamiento de enfermedades malignas, todavía no se han desarrollado pautas curativas para la mayoría de los pacientes o estas están asociadas a toxicidades poco deseables para el paciente. Por tanto, se necesitan nuevas estrategias para el tratamiento de la mayoría de las enfermedades malignas. Estas estrategias deberían tener como objetivo la maximización del efecto terapéutico, unido a la minimización de la toxicidad. Un planteamiento ha implicado el uso de ligandos específicos para receptores de la superficie celular o anticuerpos específicos para antígenos asociados a las células malignas como medio para dirigir los fármacos o radioisótopos a las células malignas. El planteamiento resulta atractivo para muchas enfermedades malignas porque las células malignas presentan en sus superficies celulares una variedad de receptores y/o antígenos hiperregulados o limitados a los tumores que se podrían utilizar como diana. Hasta ahora, se ha descubierto que los sistemas anticuerpo/antígeno son mejores que los sistemas receptores del ligando, porque están más limitados que los receptores y en mayor cantidad en la célula maligna.

- 30 A pesar de estas ventajas, los anticuerpos no han desarrollado su potencial por múltiples razones. Entre estas razones, los anticuerpos son macromoléculas (moléculas de gran tamaño) que a menudo no acceden ni penetran de forma eficaz en el tumor maligno. Por otra parte, los anticuerpos suelen ser grandes moléculas inmunogénicas y pueden inducir una respuesta inmune en el paciente dirigida contra el agente terapéutico. Por otra parte, a menudo los anticuerpos no demuestran una especificidad suficiente para el tejido diana (como el cáncer) y, por tanto, resultan útiles únicamente en pautas terapéuticas limitadas.

35 **Resumen de la invención**

- En determinadas realizaciones esta invención proporciona, tal y como se define en las reivindicaciones, nuevos ligandos de alta afinidad selectivos polidentados (SHAL) que pueden funcionar para unirse de forma específica a determinadas moléculas diana de forma análoga a la unión del anticuerpo. Se describen métodos para el diseño y la generación de SHAL como reactivos de afinidad para la investigación básica o aplicada o para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas y/o malignas y su administración a pacientes con enfermedades infecciosas y/o malignas.

- Típicamente los SHAL comprenden dos o más ligandos (fracciones de unión) que se unen cada uno a diferentes regiones de la diana pretendida unidas entre sí directamente o a través de un enlace. Cuando el SHAL está dirigido a un marcador de una célula cancerígena, el SHAL se asocia con una mayor densidad (abundancia) o accesibilidad a la célula diana en comparación con las células normales. Por

tanto, el SHAL proporciona la selectividad apropiada para el diagnóstico o el tratamiento de las células diana. Se pueden generar diferentes SHAL fácilmente para diferentes células malignas y enfermedades malignas. El SHAL representa un bloque constructivo core (por ejemplo, una fracción diana) que se puede incorporar a moléculas más grandes (como moléculas quiméricas) para efectuar la entrega específica de un efector en la diana.

5

Por tanto, esta divulgación proporciona un método para producir un ligando polidentado de alta afinidad selectivo (SHAL) que se une específicamente a una molécula diana. En determinadas divulgaciones, el método implica típicamente seleccionar una primera biblioteca de ligandos para identificar un primer ligando que se une a la molécula diana; seleccionar una segunda biblioteca de ligandos para identificar un segundo ligando que se une a la molécula diana, donde el segundo ligando es diferente del primer ligando; unir el primer ligando al segundo ligando para formar un SHAL; y seleccionar el SHAL por su capacidad para unirse específicamente a la molécula diana. En determinadas realizaciones, la molécula diana es una proteína. En determinadas realizaciones, la molécula diana es un marcador cancerígeno (por ejemplo, epítipo Lym-1, Muc-1, C-myc, p53, Ki67, Her2, Her4, BRCA1, BRCA2, Lewis Y, CA 15-3, G250, antígeno de superficie celular HLA-DR, CEA, CD20, CD22, integrina, CEA, 16, EGFr, AR, PSA, y otros receptores del factor de crecimiento, etc.). El método puede implicar también opcionalmente la selección del SHAL para identificar un SHAL que se une a la diana con una avidez y/o especificidad superior que cualquier ligando que comprende el SHAL. La primera biblioteca de ligandos y la segunda biblioteca de ligandos pueden ser la misma biblioteca o diferentes. En determinadas realizaciones, la primera y/o la segunda biblioteca de ligandos es una biblioteca de pequeñas moléculas orgánicas. En determinadas realizaciones, la selección de la primera biblioteca de ligandos y/o la selección de la segunda biblioteca de ligandos comprende una selección *in silico* virtual. La selección *in silico* virtual puede comprender la selección de una base de datos de compuesta (como MDL® Available Chemicals Directory, ChemSpider, GNU-Darwin) utilizando uno o más algoritmos utilizados en el programa DOCK. La selección *in silico* virtual puede comprender la selección de una base de datos de compuestos utilizando el programa DOCK. La selección *in silico* virtual puede implicar la selección de un primer ligando y/o múltiples ligandos que se unen a una hendidura de una proteína. En determinadas realizaciones la hendidura se identifica utilizando un algoritmo que emplea el programa SPHGEN. En determinadas realizaciones la hendidura se identifica utilizando el programa SPHGEN. La selección

10

15

20

25

30

in silico virtual puede implicar la selección de un segundo o tercer ligando que se une a regiones de la diana diferentes que los ligandos identificados cuando se selecciona la biblioteca del primer ligando.

En determinadas realizaciones, la selección de una primera biblioteca de ligandos y/o la selección de una segunda biblioteca de ligandos comprende adicionalmente la selección de uno o más ligandos identificados en la selección *in silico* virtual en un ensayo físico para determinar la capacidad de unirse a la diana. Entre los ensayos físicos adecuados se incluyen, entre otros, un ensayo BIAcore, una espectroscopia de resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación, una espectroscopia de resonancia magnética nuclear NOE de transferencia (trNOE), un ensayo ELISA, un ensayo competitivo, un ensayo de unión de tejidos, un ensayo de unión de células vivas, un ensayo de extractos celulares y similares.

35

40

La unión de los ligandos puede implicar directamente unir dos o más ligandos o unir dos o más ligandos con un enlace (por ejemplo, un enlace tipo PEG, un enlace peptídico, un enlace de avidina/biotina, un enlace de carbono de cadena recta, un enlace heterocíclico, un enlace de carbono de cadena ramificada, un dendrímero, un enlace de ácido nucleico, un enlace tiol, un enlace éster, un enlace que comprende una amina, un enlace que comprende un carboxilo, etc.). La unión puede consistir opcionalmente en unir dos o más ligandos con enlaces de diferentes longitudes para producir una biblioteca de SHAL que tienen enlaces de diferente longitud; y opcionalmente seleccionar la biblioteca de SHAL que tienen enlaces de diferente longitud para identificar los miembros de la biblioteca que tienen la avidez y/o especificidad más elevada con respecto a la diana. En determinadas divulgaciones, el método implica asimismo seleccionar el SHAL(s) para identificar un SHAL que se une a la diana con una avidez y/o especificidad superior que cualquier ligando que comprende el SHAL. La selección de ligandos individuales y/o uno o varios SHAL bivalentes o polivalentes se puede realizar a través de cualquiera de una variedad de métodos entre los que se incluyen, entre otros, un ensayo BIAcore, una espectroscopia de resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación, una espectroscopia de resonancia magnética nuclear NOE de transferencia (trNOE), un ensayo ELISA, un ensayo competitivo, un ensayo de unión de tejidos, un ensayo de unión de células vivas, un ensayo de extractos celulares y similares. En determinadas realizaciones, la molécula diana es una proteína y/o un marcador cancerígeno (por ejemplo, epítipo Lym1, Muc-1, C-myc, p53, Ki67, Her2, Her4, BRCA1, BRCA2, Lewis Y, CA 15-3, G250, antígeno de superficie celular HLA- DR, etc.).

45

50

55

60

También se proporciona un método para sintetizar un inhibidor para una enzima u otro receptor o proteína de unión. En determinadas realizaciones, el método implica típicamente identificar una primera hendidura (o protuberancia) y una segunda o tercera hendidura (o protuberancia) en la enzima u otro receptor o proteína de unión, donde la primera, segunda y tercera hendiduras flanquean los lados opuestos del punto activo o punto de unión de la enzima u otro receptor o proteína de unión; seleccionar una primera biblioteca de ligandos para identificar un primer ligando que se une a la primera hendidura (o

protuberancia); seleccionar una segunda biblioteca de ligandos para identificar un segundo ligando que se une a la segunda hendidura (o protuberancia); seleccionar una tercera biblioteca de ligandos para identificar un tercer ligando que se une a una tercera hendidura o protuberancia; unir el primer ligando a los ligandos segundo y tercero para formar un ligando de alta afinidad selectivo polidentado (SHAL); y seleccionar el SHAL por su capacidad para unirse de forma específica y para inhibir la enzima u otra proteína de unión. En determinadas divulgaciones, las hendiduras o "protuberancias" no tienen que estar ubicadas en lados opuestos del punto activo o punto de unión de la enzima o del receptor o la proteína de unión, sino simplemente estar ubicadas de forma que la unión del SHAL bloquee la unión del ligando cognado nativo a ese punto. En determinadas realizaciones, la molécula diana comprende una molécula seleccionada del grupo compuesto por una proteína, una enzima, un ácido nucleico, una proteína de unión a ácido nucleico y un carbohidrato. En determinadas divulgaciones, el método implica asimismo seleccionar el SHAL para identificar un SHAL que se une a la diana con una avidez y/o especificidad superior que cualquier ligando que comprende el SHAL. La primera, segunda y tercera bibliotecas de ligandos pueden ser la misma biblioteca o diferentes. En determinadas realizaciones, la primera y/o la segunda y/o la tercera biblioteca de ligandos es una biblioteca de pequeñas moléculas orgánicas. En determinadas realizaciones, la selección de la primera, la segunda y/o la tercera biblioteca de ligandos comprende una selección *in silico* virtual. La selección *in silico* virtual puede comprender la selección de una base de datos de compuestos (como MDL® Available Chemicals Directory) utilizando uno o más algoritmos utilizados en el programa DOCK. La selección *in silico* virtual puede comprender la selección de una base de datos de compuestos utilizando el programa DOCK. La selección *in silico* virtual puede implicar la selección de un primer, un segundo y/o un tercer ligando que se une a una hendidura de una proteína. En determinadas realizaciones la hendidura se identifica utilizando un algoritmo que emplea el programa SPHGEN. En determinadas realizaciones la hendidura se identifica utilizando el programa SPHGEN. La selección *in silico* virtual puede implicar la selección de un segundo ligando que se une a una región de la diana diferente que los ligandos identificados cuando se selecciona la primera biblioteca de ligandos.

En determinadas realizaciones, la selección de una primera, una segunda o una tercera biblioteca de ligandos y/o la selección de una segunda biblioteca de ligandos comprende adicionalmente la selección de uno o más ligandos identificados en la selección *in silico* virtual en un ensayo físico para determinar en un ensayo físico para determinar la capacidad de unirse a la diana. Entre los ensayos físicos adecuados se incluyen, entre otros, un ensayo BIAcore, una espectroscopia de resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación, una espectroscopia de resonancia magnética nuclear NOE de transferencia (trNOE), un ensayo ELISA, un ensayo competitivo, un ensayo de unión de tejidos, un ensayo de unión de células vivas, un ensayo de extractos celulares y similares.

La unión de los ligandos puede implicar directamente unir dos o más ligandos o unir dos o más ligandos con un enlace (por ejemplo, un enlace tipo PEG, un enlace peptídico, un enlace de avidina/biotina, un enlace de carbono de cadena recta, un enlace heterocíclico, un enlace de carbono de cadena ramificada, un dendrímero, un enlace de ácido nucleico, un enlace tiol, un enlace éster, un enlace que comprende una amina, un enlace que comprende un carboxilo, etc.). La unión puede consistir opcionalmente en unir los ligandos con enlaces de diferentes longitudes para producir una biblioteca de SHAL que tienen enlaces de diferente longitud; y opcionalmente seleccionar la biblioteca de SHAL que tienen enlaces de diferente longitud para identificar los miembros de la biblioteca que tienen la avidez y/o especificidad más elevada con respecto a la diana.

La invención proporciona, tal y como se define en las reivindicaciones, un ligando de alta afinidad selectivo polidentado (SHAL) que se une específicamente a una diana deseada (por ejemplo, una célula cancerígena). La diana es una célula cancerígena. El SHAL comprende un primer ligando que se une a un primer punto de un marcador para la célula cancerígena unida (directamente o a través de un enlace) a un segundo o tercer ligando que se une a un segundo o tercer punto del mismo marcador o de un marcador diferente para la célula cancerígena, donde el primer punto, el segundo punto y el tercer punto son puntos diferentes (por ejemplo, los tres ligandos son capaces de unirse de forma simultánea a la diana o dianas). En determinadas realizaciones, el primer punto, el segundo punto y/o el tercer punto es una hendidura (o "protuberancia") en el marcador o marcadores. Entre los marcadores adecuados se incluyen, entre otros, un epítipo Lym-1, Muc-1, C-myc, p53, Ki67, Her2, Her4, BRCA1, BRCA2, Lewis Y, CA 15-3, G250, el antígeno de superficie celular HLA-DR, CEA, CD20, CD22, integrina, CEA, 16, EGFr, AR, PSA, otros receptores del factor de crecimiento y similares.

En determinadas realizaciones preferibles, el marcador es un antígeno de superficie celular HLA-DR.

En determinadas realizaciones, los tres ligandos se unen a puntos de un epítipo reconocido por el Lym-1 u otros anticuerpos específicos del HLA-DR. En determinadas realizaciones, los tres ligandos son moléculas orgánicas pequeñas. En determinadas realizaciones, el primer ligando es un ligando seleccionado de la Tabla 1 y el segundo y el tercer ligando, cuando están presentes, son independientemente seleccionados de los ligandos de las Tablas 1, 5, 6, 7 u 8. En determinadas realizaciones, el SHAL comprende un primer, un segundo y/o un tercer ligando seleccionado de las Tablas 2, 3, o 4. En determinadas realizaciones, el SHAL comprende un primer, un segundo y/o un tercer ligando seleccionado de la Tabla 4. Los tres ligandos se pueden unir directamente o el primer ligando se puede

5 unir al segundo y/o al tercer ligando a través de un enlace (por ejemplo, un enlace tipo PEG, un enlace peptídico, un enlace de avidina/biotina, un enlace de carbono de cadena recta, un enlace heterocíclico, un enlace de carbono de cadena ramificada, un dendrímero, un enlace de ácido nucleico, un enlace tiol, un enlace éster, un enlace que comprende una amina, un enlace que comprende un carboxilo, etc.). En determinadas realizaciones, el SHAL tiene una avidéz para el marcador superior a 10^{-6} M, mientras que los ligandos individuales que comprenden el SHAL tienen cada uno una afinidad de unión con el marcador inferior a 10^{-6} M. En determinadas realizaciones, el SHAL tiene una fórmula como la mostrada aquí y en las Figuras o es análoga a la misma.

10 Esta invención proporciona asimismo moléculas quiméricas que comprenden un SHAL como el aquí descrito unido a un efector (por ejemplo, un marcador de epítipo, un segundo SHAL, un anticuerpo, una etiqueta, una citotoxina, un liposoma, un radionúclido, un fármaco, un profármaco, una partícula viral, una citoquina y un quelato). En determinadas realizaciones, el efector es un marcador de epítipo seleccionado del grupo compuesto por una avidina y una biotina. En determinadas realizaciones, el efector es una citoquina seleccionada del grupo compuesto por una toxina de difteria, una exotoxina de *Pseudomonas*, una ricina, una abrina y una quinasa de timidina. En determinadas realizaciones, el efector es un quelato que comprende un isótopo de metal seleccionado del grupo compuesto por ^{99}Tc , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{52}Fe , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , y $^{\text{m}}\text{Ag}$. En determinadas realizaciones, el efector es un

20 quelato que comprende un emisor alfa (por ejemplo, bismuto 213). En determinadas realizaciones, el efector es un quelato que comprende DOTA. En determinadas realizaciones, el efector de un lípido o un liposoma (por ejemplo, un liposoma que contiene un fármaco).

25 En otra realización más, esta invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un ligando de alta afinidad selectivo polidentado (SHAL) que se une específicamente a una célula cancerígena como se ha descrito en el presente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la formulación se puede proporcionar como una formulación de dosis unitaria. En determinadas realizaciones, la formulación se puede proporcionar como una formulación de liberación prolongada.

30 Esta invención proporciona asimismo una formulación farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y una molécula quimérica que comprende un SHAL como el descrito en el presente. En determinadas realizaciones, la formulación se puede proporcionar como una formulación de dosis unitaria. En determinadas realizaciones, la formulación se puede proporcionar como una formulación de liberación prolongada.

35 Se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación de una célula cancerígena. Los métodos típicamente implican poner en contacto la célula cancerígena (por ejemplo, una célula metastásica, una célula tumoral, etc.) con un ligando de alta afinidad selectivo polidentado (SHAL) que se une específicamente a una célula cancerígena y/o con una molécula quimérica que comprende un ligando de alta afinidad selectivo polidentado (SHAL) que se une específicamente a una célula cancerígena unida a un efector (por ejemplo, fármaco, liposoma, citotoxina, radionúclido o quelante).

40 En determinadas realizaciones, esta invención proporciona SHAL que se unen específicamente a una diana deseada. La diana puede ser cualquier diana para la que se desee crear una fracción de unión. El SHAL comprende típicamente dos o más ligandos unidos directamente o a través de un enlace, donde un primer ligando se une a un primer punto de la diana y el segundo y/o tercer ligando se une al segundo y/o tercer punto de la diana del mismo marcador diana, donde el primer, el segundo y/o el tercer punto son puntos diferentes (por ejemplo, los tres ligandos son capaces de unirse simultáneamente a la diana o dianas). En determinadas realizaciones, el primer punto, el segundo punto y/o el tercer punto es una hendidura (o "protuberancia") en la diana o dianas. En determinadas realizaciones, el primer, el segundo y/o el tercer punto se encuentran en la misma molécula diana.

50 Esta invención proporciona asimismo diversos métodos de detección. En determinadas realizaciones, esta invención proporciona un método para detectar una célula cancerígena. El método implica típicamente poner en contacto la célula cancerígena con una molécula quimérica que comprende un SHAL que se une específicamente a una célula cancerígena (por ejemplo, a un marcador cancerígeno) unida a una etiqueta detectable (por ejemplo, un emisor de gamma, un emisor de positrones, un emisor de rayos X, un emisor de alfa, un emisor de fluorescencia, etc.) y detectar la presencia o ausencia de la etiqueta detectable. En determinadas realizaciones, el método implica típicamente poner en contacto una célula cancerígena con una molécula quimérica que comprende un SHAL que se une específicamente a una célula cancerígena (por ejemplo, a un marcador cancerígeno) unida a un marcador de epítipo; poner en contacto la molécula quimérica con un quelato que comprende una fracción detectable por la que el quelato se une al marcador de epítipo, asociando así la fracción detectable con el quelato; y detectar la fracción detectable. En determinadas realizaciones, la fracción detectable es un radionúclido (por ejemplo, un emisor de gamma, un emisor de positrones, un emisor de alfa, un emisor de rayos X, etc.). En determinadas realizaciones, la detección comprende la visualización de imágenes externas y/o la visualización de imágenes internas. En determinadas realizaciones, la fracción detectable comprende un isótopo de metal seleccionado del grupo

compuesto por ^{99}Tc , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{52}Fe , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , y ^{111}Ag . En determinadas realizaciones, el quelato comprende DOTA. En determinadas realizaciones, el marcador de epítipo es una avidina o una biotina.

5 Esta invención contempla asimismo kits para crear y/o utilizar SHAL de esta invención y/o moléculas quiméricas que comprenden SHAL de esta invención. En determinadas realizaciones, el kit comprende un contenedor que contiene un SHAL como el descrito en el presente y/o contenedores que contienen ligandos para unirse a un SHAL como el descrito en el presente. El kit puede incluir opcionalmente uno o más enlaces, uno o más efectores (quelatos, radionúclidos, etc.) y similares. En determinadas
10 realizaciones, el SHAL se encuentra en un excipiente farmacológicamente aceptable.

En determinadas realizaciones, esta invención excluye de forma expresa los SHAL en los que las fracciones de unión que comprenden los SHAL son anticuerpos, anticuerpos de cadena simple y similares. En determinadas realizaciones, los SHAL no son anticuerpos polivalentes ni anticuerpos de cadena simple polivalentes. En determinadas realizaciones, los ligandos que comprenden los SHAL no son proteínas. En determinadas realizaciones, esta invención excluye de forma expresa los SHAL en los que las fracciones de unión que comprenden los SHAL se unen preferible y/o específicamente a ácidos nucleicos. En determinadas realizaciones, los ligandos que comprenden los SHAL son moléculas orgánicas pequeñas.

Definiciones

20 Los términos "unión específica" o "unión preferente" se refieren a la unión que se produce entre pares de especies como enzima/sustrato, receptor/agonista, anticuerpo/antígeno y lectina/carbohidrato que puede estar mediada por interacciones covalentes y/o no covalentes. Cuando la interacción de las dos especies produce típicamente un complejo unido de forma no covalente, la unión que se produce es típicamente electrostática, y/o por enlace de hidrógeno y/o el resultado de interacciones lipofílicas. Por consiguiente, la
25 "unión específica" ocurre entre pares de especies cuando existe una interacción entre las dos que produce un complejo unido. En particular, la unión específica se caracteriza por la unión preferente de un miembro de una pareja a una especie concreta en comparación con la unión de ese miembro de la pareja a otras especies de la familia de compuestos a la que pertenece esa especie. Así, por ejemplo, un ligando puede mostrar una afinidad por una hendidura concreta en una molécula de HLA-DR10 que es al menos dos veces, preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 100 veces, al menos 1000 veces o al menos 10 000 veces mayor que su afinidad por una hendidura diferente en la misma proteína o en otras relacionadas.

Los términos "ligando" o "fracción de unión", a efectos del presente, se refieren generalmente a una molécula que se une a una molécula diana concreta y forma un complejo unido como se ha descrito
35 anteriormente. La unión puede ser una unión altamente específica. No obstante, en determinadas realizaciones, la unión de un ligando individual a la molécula diana puede ser con una afinidad y/o especificidad relativamente baja. El ligando y su correspondiente molécula diana forman una pareja de unión específica. Entre los ejemplos se incluyen, entre otros, pequeñas moléculas orgánicas, azúcares, lectinas, ácidos nucleicos, proteínas, anticuerpos, citoquinas, proteínas receptoras, factores del crecimiento, proteínas de unión a ácido nucleico y similares, que se unen específicamente a las moléculas diana deseadas, a colecciones diana de moléculas, a receptores diana, a células diana y similares.

El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable
45 al de las moléculas orgánicas generalmente utilizadas en el sector farmacéutico. El término excluye las macromoléculas biológicas naturales (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferibles tienen un tamaño máximo aproximado de 5000 Da, más preferiblemente de 2000 Da y más preferiblemente de 1000 Da.

El término "biblioteca de ligandos" se refiere a una colección (por ejemplo, a una pluralidad) de ligandos o potenciales ligandos. La biblioteca de ligandos puede ser una biblioteca física real de ligandos y/o una base de datos (por ejemplo, una base de datos de compuestos que comprende descripciones de una pluralidad de potenciales ligandos, como MDL® Available Chemicals Directory, ChemSpider y similares).
50

El término "SHAL" se refiere a una molécula que comprende una pluralidad de ligandos que se unen cada uno de ellos a una región diferente de la molécula diana a la que se dirige el SHAL. Los ligandos se unen directamente o a través de un enlace para formar una fracción polidentada que típicamente muestra una elevada avididad por la molécula diana. En determinadas realizaciones, el SHAL comprende dos o más
55 ligandos que se unen a su diana con baja afinidad (por ejemplo, $<10^{-6}\text{M}$ y/o se disocian en unos segundos o menos) que, cuando se unen, forman un SHAL que se une a la diana con una afinidad elevada (por ejemplo $>10^{-6}\text{M}$, o $>10^{-7}\text{M}$, o $>10^{-8}\text{M}$ y/o se disocian lentamente, por ejemplo en unas horas o días).

El término "polidentado", cuando se utiliza con respecto a un SHAL, indica que el SHAL comprende dos o más ligandos. Los ligandos típicamente se unen a diferentes partes de la diana a la que está dirigida el SHAL.
60

Los términos "bidentado", "tridentado", etc., cuando se utilizan con respecto a un SHAL, se refieren a

SHAL que constan de dos ligandos, SHAL que constan de tres ligandos,
etc.

El término "SHAL polivalente" se refiere a una molécula en la que se unen dos o más SHAL (por ejemplo, dos o más SHAL bidentados). Así, por ejemplo, un SHAL bivalente se refiere a una molécula en la que se unen dos SHAL. Un SHAL trivalente se refiere a una molécula en la que se unen tres SHAL, etc. Una versión bivalente del SHAL bidentado JP459B se ilustra en la Figura 14.

Un "SHAL poliespecífico" son dos o más SHAL unidos donde cada uno de los SHAL es polidentado y cualquiera de ellos o ambos pueden ser sintetizados polivalentes (o generados de otro modo), de forma que tengan dos o más dianas para cada SHAL (conjunto de poliligandos). Por ejemplo, un SHAL puede ser sintetizado con dos o más ligandos para las cavidades de HLA-DR y las cavidades de un CDXX, por ejemplo CD20 o CD22, o de los tres, etc. Otro ejemplo implica la unión de un SHAL MUC-1 y un SHAL antilinfoma, porque algunos linfomas presentan una sobreexpresión de los receptores tradicionales de HLA-DR y CD y de MUC (regulación al alza). Un SHAL sintetizado con dos o más ligandos para las cavidades de HLA-DR y las cavidades para un quelato, por ejemplo DOTA, etc., donde en las dianas SHAL univalentes o bivalentes la célula maligna y el segundo módulo univalente o bivalente captura un agente administrado posteriormente, por ejemplo un radiometal quelado con DOTA o un profármaco diseñado para activar el fármaco transportado a la célula maligna por el primer SHAL.

El término "*in silico virtual*" cuando se utiliza por ejemplo con respecto a los métodos de selección, se refiere a métodos que se llevan a cabo sin una selección física real de las fracciones en cuestión. Típicamente la selección *in silico* virtual se realiza por medios informáticos, por ejemplo utilizando modelos de las moléculas de interés concretas. En determinadas realizaciones, los métodos virtuales se pueden realizar utilizando modelos físicos de las moléculas en cuestión y/o mediante una simple inspección visual y manipulación.

La expresión "diana para un SHAL" se refiere a la fracción a la que se va a unir específicamente el SHAL bidentado o polidentado.

La expresión "un algoritmo que se encuentra en. . .", por ejemplo "un algoritmo que se encuentra en SPHGEN", se refiere a un algoritmo que es aplicado por (que se encuentra en) el mencionado software. El algoritmo, sin embargo, puede ser aplicado manualmente o a través de un programa distinto del mencionado software y continuar representando un uso de un algoritmo que se encuentra en el mencionado software.

El término "hendidura" cuando se refiere a una hendidura en una proteína quiere decir una cavidad,

indentación o depresión en la superficie de la molécula de proteína que se crea como resultado del pliegue de la cadena peptídica en la estructura tridimensional que hace la proteína funcional. Una hendidura se puede reconocer fácilmente mediante la inspección de la estructura de la proteína y/o utilizando softwares de modelado disponibles en el mercado (por ejemplo, DOCK).

El término "marcadores cancerígenos" se refiere a biomoléculas como proteínas que son

útiles para el diagnóstico y pronóstico del cáncer. A efectos del presente, "marcadores cancerígenos" incluye, entre otros lo siguiente: PSA, gonadotropina coriónica humana, alfa-fetoproteína, antígeno carcinoembrionario, antígeno cancerígeno (CA) 125, CA 15-3, CD20, CDH13, CD 31, CD34, CD105, CD146, D16S422HER-2, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa), tripsina, complejo de tripsina-1 con alf(1)-antitripsina, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, c-erbB-2, bc1-2, fracción de fase sintética (SPF), p185erbB-2, insulina de baja afinidad como proteína de unión a factor de crecimiento, factor de tejido urinario, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento epidérmico, receptor del factor de crecimiento epidérmico, proteínas de apoptosis (p53, Ki67), factor VIII, proteínas de adhesión (CD-44, sialil-TN, grupo sanguíneo A, lacZ bacteriano, fosfatasa alcalina placentaria humana (ALP), alfa-difluorometilornitina (DFMO), timidina fosforilasa (dThdPase), thrombomodulina, receptor de laminina, fibronectina, anticiclina,

anticiclina A, B o E, antígeno nuclear asociado a proliferación, lectina UEA-1, CEA, 16 y factor de von Willebrand.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de forma intercambiable en el presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. El término se aplica a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial del correspondiente aminoácido presente naturalmente, así como de polímeros de aminoácidos presentes naturalmente. El término también incluye variantes en la unión peptídica tradicional que une a los aminoácidos que componen el polipéptido.

Los términos "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales se refieren, a efectos del presente, al menos a dos nucleótidos unidos covalentemente. Un ácido nucleico de la presente invención es preferiblemente de cadena simple o doble y por lo general contendrá enlaces de fosfodíéster, aunque en algunos casos, como se señala más adelante, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener cadenas alternativas y que comprenden, por ejemplo, fosforamida (Beaucage et al. (1993)

- Tetrahedron* 49(10): 1925) y las referencias a este; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl *et al.* (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579; Letsinger *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:3487; Sawai *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; y Pauwels *et al.* (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419), fosforotioato (Mag *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; y Patente USA Nº 5 644 048), fosforoditioato (Briu *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321, enlaces de O- metilfosforoamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), y enlaces y cadenas de ácido nucleico peptídico (véase Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier *et al.* (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson *et al.* (1996) *Nature* 380: 207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas positivas (Denpcy *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097; cadenas no iónicas (Patentes USA Nº 5 386 023, 5 637 684, 5 602 240, 5 216 141 y 4 469 863; Angew. (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger *et al.* (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; Capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook;
- 15 Mesmaecker *et al.* (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs *et al.* (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y cadenas sin ribosa, incluyendo las descritas en las Patentes USA Nº 5 235 033 y 5 034 506, y Capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed.
- 20 Y.S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos en la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins *et al.* (1995), *Chem. Soc. Rev.* pp.169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen en Rawls, C & E News, 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones de la cadena de ribosa-fosfato se pueden realizar para facilitar la adición de fracciones adicionales como etiquetas, o para aumentar la estabilidad y la vida útil de estas moléculas en entorno fisiológicos.
- 25 El término "biotina" se refiere a biotina y biotinas modificadas o análogos de biotina que son capaces de unirse a avidina o a diversos análogos de avidina. La "biotina" puede ser, entre otras cosas, modificada mediante la adición de uno o más compuestos, habitualmente a través de su residuo de carboxilo libre. Entre los derivados de biotina útiles se incluyen, entre otros, ésteres activos, aminas, hidrazidas y grupos tiol que están unidos con un grupo reactivo complementario como amina, un grupo alquilo o acilo, un grupo carbonilo, un haluro de alquilo o un aceptor tipo Michael en el polímero o compuesto añadido.
- 30 La avidina, que se encuentra típicamente en la clara de huevo, tiene una afinidad de unión muy elevada con la biotina, que es una vitamina del complejo B (Wilcheck *et al.* (1988) *Anal. Biochem.* 171:1). La estreptavidina, obtenida de *Streptomyces avidinii*, es similar a la avidina, pero presenta una unión tisular no específica inferior y, por tanto, a menudo se utiliza en lugar de la avidina. A efectos del presente, la "avidina" incluye todas sus formas biológicas sea en su estado natural o en sus formas modificadas. Las formas modificadas de la avidina que han sido tratadas para eliminar los residuos de carbohidrato de la proteína ("avidina desglucosilada") y/o su carga altamente básica ("avidina neutra"), por ejemplo, también resultan útiles en la invención.
- A efectos del presente, el término residuo se refiere a aminoácidos naturales, sintéticos o modificados.
- 40 A efectos del presente, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que consta de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulinas o fragmentos de genes de inmunoglobulinas. Los genes de inmunoglobulinas reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alpha, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.
- 45 Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina típica (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, donde cada par tiene una cadena "ligera" (unos 25 kD) y una cadena "pesada" (unos 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de unos 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.
- 50 Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas como como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos mediante digestión con diversas peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces de disulfuro en la región bisagra para producir F(ab)₂, un dímero de Fab que es por sí mismo una cadena ligera unida a V_H-C_H1 a través de un enlace de disulfuro. El F(ab)₂ puede ser reducido en condiciones suaves para romper el enlace de disulfuro en la región diana, convirtiendo así el dímero (Fab)₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es básicamente un Fab con parte de la región bisagra (véase, *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para obtener una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). A pesar de que varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en
- 55
60

la técnica apreciará que estos fragmentos Fab' se pueden sintetizar *de novo* por medios químicos o utilizando una metodología de ADN recombinante. Por tanto, a efectos del presente, el término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpo producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante. Los anticuerpos preferibles incluyen anticuerpos de cadena simple (anticuerpos que existen como una cadena polipeptídica simple), más preferiblemente anticuerpos Fv de cadena simple (sFv o scFv) en los que una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen (directamente o mediante un enlace peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv de cadena simple está unido covalentemente al heterodímero V_H-V_L, que puede ser expresado por un ácido nucleico que incluye secuencias de codificación V_H- y V_L- unidas directamente o unidas a través de un enlace que codifica péptidos. Huston, *et al.* (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883. A pesar de que V_H y V_L están conectados como una cadena polipeptídica simple, los dominios V_H y V_L se asocian de forma no covalente. Las primeras moléculas del anticuerpo funcional en expresarse en la superficie del fago filamentoso fueron Fv de cadena simple (scFv); sin embargo, también han prosperado otras estrategias de expresión. Por ejemplo, las moléculas Fab se pueden presentar en un fago si una de las cadenas (pesada o ligera) se fusiona con una proteína de cápside g3 y la cadena complementaria es exportada al periplasma de una molécula soluble. Las dos cadenas se pueden codificar en el mismo replicón o en replicones diferentes; lo importante es que las dos cadenas del anticuerpo de cada molécula Fab se unan postranslacionalmente y que el dímero se incorpore a la partícula de fago a través del enlace de una o más de las cadenas a, por ejemplo, g3p (véase, por ejemplo, la Patente USA N° 5733743). Los anticuerpos scFv y varias otras estructuras que convierten las cadenas polipeptídicas pesada y ligera naturalmente agregadas pero químicamente separadas de la región V de un anticuerpo en una molécula que se pliega en una estructura tridimensional similar a la estructura de un punto de unión de antígeno son conocidos por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes USA N° 5 091 513, 5 132 405 y 4 956 778). Los anticuerpos particularmente preferibles incluirán todos los que se han presentado en un fago o una levadura (por ejemplo, scFv, Fv, Fab y Fv con enlace de disulfuro (Reiter *et al.* (1995) *Protein Eng.* 8:1323-1331).

A efectos del presente, la expresión "se une específicamente", cuando se refiere a un SHAL o a una biomolécula (por ejemplo, proteína, ácido nucleico, anticuerpo, etc.), se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia del SHAL o biomolécula en una población heterogénea de moléculas (por ejemplo, proteínas y otras biológicas). Por tanto, en las condiciones designadas (por ejemplo, condiciones de ensayo de unión en el caso de un SHAL, o condiciones de hibridación rigurosas en el caso de un ácido nucleico), el ligando especificado o SHAL se une de forma preferente a su molécula "diana" concreta y no se une de forma preferente a una cantidad importante de otras moléculas presentes en la muestra.

Un "efector" se refiere a cualquier molécula o combinación de moléculas cuya actividad es recomendable para llegar hasta y/o localizar una diana (por ejemplo, en una célula que presenta un marcador característico). Los efectores incluyen, entre otros, etiquetas, citotoxinas, enzimas, factores de crecimiento, factores de transcripción, fármacos, lípidos, liposomas, etc.

Un "reporter" es un efector que proporciona una señal detectable (por ejemplo, es una etiqueta detectable). En determinadas realizaciones, el reporter no necesita proporcionar la señal detectable por sí mismo, sino que simplemente proporciona una fracción que posteriormente se puede unir a una etiqueta detectable.

El término "sustitución conservadora" se utiliza en relación con las proteínas o

péptidos para reflejar sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad (especificidad o afinidad de unión) de la molécula. Típicamente, las sustituciones conservadoras de aminoácidos implican la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Los siguientes seis grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras típicas entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Los términos "marcador de epítipo" o "marcador de afinidad" se utilizan de forma intercambiable a efectos del presente y por lo general se refieren a una molécula o un dominio de una molécula que es específicamente reconocido por un anticuerpo u otro vinculante de unión. El término se refiere también al complejo del vinculante de unión. Así, por ejemplo, la biotina o un complejo de biotina/avidina se consideran ambos un marcador de afinidad. Además de los epítipos reconocidos en interacciones de epítipo/anticuerpo, los marcadores de afinidad comprenden asimismo "epítipos" reconocidos por otras moléculas de unión (por ejemplo, ligandos a los que se han unido receptores), ligandos a los que se han unido otros ligandos para formar heterodímeros u homodímeros, His6 a los que se ha unido Ni-NTA, biotina a la que se ha unido avidina, estreptavidina, o anticuerpos anti-biotina y similares.

Los marcadores epítipos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por otra parte, en el mercado hay disponibles anticuerpos específicos para una amplia variedad de marcadores epítipos. Estos incluyen, entre otros, anticuerpos contra el epítipo DYKDDDDK (SEC. ID N°: 1), anticuerpos c-myc

(comercializados por Sigma, St. Louis), el epítipo del carbohidrato HNK-1, el epítipo HA, el epítipo HSV, los epítipos His₄, His₅, y His₆ que son reconocidos por los anticuerpos específicos para el epítipo His (véase, por ejemplo, Qiagen) y similares. Por otra parte, se comercializan vectores para proteínas con marcadores de epítipos. Así, por ejemplo, el vector pCMV-Tag1 es

5 un vector marcador de epítipo diseñado para la expresión del gen en células de mamífero. Un gen diana insertado en el vector pCMV-Tag1 puede ser marcado con el epítipo FLAG® (N-terminal, C-terminal o marcador interno), el epítipo c-myc (C-terminal) o tanto con el epítipo FLAG (N- terminal) como con el c-myc (C-terminal).

Un enlace tipo PEG se refiere a un enlace que contiene un glicol de polietileno (PEG).

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un método para crear SHAL identificando ligandos individuales (azul) que se unen a dos puntos únicos de la superficie de una diana (por ejemplo, HLA-DR10 que incluye el epítipo Lym-1 (aminoácidos rojos, verdes, amarillos)) y unirlos sintéticamente para producir una molécula que se une a ambos puntos.

15 La Figura 2 ilustra el uso de microarrays tisulares que contienen, por ejemplo, una gran cantidad tanto de tejidos normales como de neoplasias linfocíticas. Estos tejidos pueden ser tratados con SHAL marcados con biotina, enjuagados por estreptavidina marcada con rodamina, y la unión del SHAL se puede comprobar mediante microscopía de fluorescencia.

20 La Figura 3 ilustra un microarray de tejido humano que comprende cores de tejido teñidos con eosina y hematoxilina, fijados con formalina e insertados en parafina. Los cuatro paneles se obtienen de una imagen única digital de ScanScope. Esto ilustra la alta resolución de la imagen archivada. Se pueden obtener imágenes similares para los estudios de unión SHAL o inmunohistoquímica.

De este modo, los investigadores que utilizan los arrays disponen de un fácil acceso compartido a todos los estudios aplicados a los arrays.

25 La Figura 4A ilustra la organización del MUC-1 normal. El MUC-1 anómalo, también una buena diana, está menos glicosilado, tiene un VNTR expuesto y una unidad de repetición en tándem: 20

aa GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH (SEC. ID. N°: 2). La Figura 4B ilustra las características

30 estructurales conservadas del dominio de repetición en tándem de MUC-1. Estas características incluyen la repetición y protuberancia de estructuras en forma de nudos que consisten en giros inversos secuenciales que abarcan interfaces de repetición en tándem (residuos 17-27, 37-47) y una región ampliada que consiste en poliprolina II y estructura de cadena beta (residuos 10-15, 30-25, 50-55). Los residuos 2-3 del extremo N-terminal y C-terminal no están ordenados debido a la ausencia de repeticiones en tándem contiguas.

35 La Figura 5 ilustra un array tisular de un cáncer de próstata teñido con anticuerpos monoclonales anti-muc1.

La Figura 6 muestra que el cáncer de próstata presentaba una mayor tinción del péptido MUC-1 asociada con el grado y la fase.

La Figura 7 muestra un péptido core MoAb BrE-3 anti MUC1 que demuestra el epítipo

40 diana en un cáncer de próstata de grado 4. Los nudos del MUC-1 difieren en los diferentes grados del cáncer de próstata. Por consiguiente, se pueden diseñar SHAL que se unen a los nudos y que se pueden utilizar para asignar un grado al tejido maligno.

45 La Figura 8 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las moléculas de HLA-DR con estructuras de cristales conocidas. Los códigos PDB identifican las secuencias de moléculas HLA-DR1(1aqd), HLA-DR2(1bx2), HLA-DR3(1a6a) y HLA-DR4 (1dm5). 1i3r es una proteína de fusión de MHC homóloga. Hla_DR10:(SEC. ID. N°: 3), 1aqd_B:(SEC. ID. N°: 4), 1d5m_B(SEC. ID. N°: 5), 1bx2_B:(SEC. ID. N°: 6), 1a6a_B:(SEC. ID. N°: 7), 1i3r_B:(SEC. ID. N°: 8).

Figura9 Modelo de homología de la subunidad beta de HLA-DR10 que muestra los dos dominios estructurales (véase el color en el Apéndice).

50 La Figura 10 muestra la superposición de la estructura de cristal de HLA-DR3 (átomos transparentes, azul claro) y el modelo de homología de HLA-DR10 (átomos coloreados, azul oscuro) que demuestra la similitud estructural en la región de la subunidad beta que comprende el epítipo Lym-1. Los residuos de aminoácidos críticos para la unión de Lym-1 se muestran como átomos que rellenan los espacios.

55 La Figura 11 muestra gráficos de superficie de subunidades beta de HLA-DR10 y HLA-DR3 que muestran las diferencias en la estructura de las "hendiduras" de la región de la proteína que comprende el epítipo Lym-1. La distribución de la carga se muestra en azul oscuro (positiva o básica), rojo (negativa o ácida) y azul claro (neutra o hidrófoba). El átomo de azufre de la cisteína se muestra en amarillo.

La Figura 12 ilustra la ubicación de dos "hendiduras", designadas punto 1 (rojo) y punto 2 (azul), que rodean a los aminoácidos críticos para la unión de Lym-1 (amarillo) a la

subunidad beta de HLA-DR10. Estos dos puntos eran las dianas para la unión del ligando y se utilizaron en los estudios de docking por ordenador.

5 Las Figuras 13A y 13B ilustran SHAL bidentados sintetizados mediante combinación

de los pares adecuados de los ligandos individuales identificados por unirse a HLA-DR10. La Figura 13^a ilustra las tres moléculas. La Figura 13B ilustra dos SHAL, sintetizados mediante unión de desoxicolato y 5-leu-encefalina, que han demostrado unirse a HLA-DR10 aislados con afinidades nM. La parte roja es un ligando (desoxicolato), la verde es el otro ligando (por ejemplo, 5-leu-encefalina), la azul es una lisina utilizada para producir un enlace más corto, y la negra es una combinación de cosas: las moléculas PEG usadas para alargar el enlace entre los dos ligandos, y una molécula de biotina unida al SHAL a efectos del ensayo.

10 La Figura 14 ilustra la estructura de una versión bivalente de JP459B. El rojo es desoxicolato; el verde es 5-le-encefalina; el azul es el conector de lisina; y el negro es el enlace PEG y biotina.

La Figura 15 ilustra un diagrama de flujo que describe los principales pasos de la elaboración de modelos de proteínas basados en homologías.

La Figura 16 ilustra un algoritmo de DOCK. (1) Se genera una "imagen negativa" rellenando una hendidura de esferas. (2) Se recupera un ligando candidato de una base de datos. (3) Se equiparan las distancias internas entre un subconjunto de centros de esferas y átomos de ligandos (normalmente se eligen entre tres y ocho centros). (4) El ligando se orienta hacia el punto activo. (5) La interacción para esa orientación es evaluada mediante una función de puntuación; el proceso se repite para otras orientaciones —típicamente se generan 10 000 orientaciones por ligando. La orientación con la puntuación más alta se conserva. El proceso se repite para un nuevo ligando de la base de datos.

20 Las Figuras 17A y 17B ilustran la unión de SHAL JP459B a células que presentan HLA-DR10. La Figura 17A ilustra la unión aumentada de SHAL JP459B y Lym-1 Mab en el linfoma de células grandes en comparación con el linfoma de células pequeñas (paneles A-D) y la unión selectiva de células Raji vivas (cristal teñido de violeta) pero de ningún otro tipo de células en las placas recubiertas con peroxidasa de rábano-estreptavidina (SHRP) y SHAL biotinilado (paneles E-H). (paneles A-D) Los SHAL fueron preincubados con SAHRP y detectados mediante reactivo DAB. La unión de Lym-1 se detectó con un MAb anti-ratón biotinilado, seguido de SAHRP y DAB. Panel A) SHAL en linfoma de células grandes Panel B) SHAL en linfoma de células pequeñas Panel C) Lym-1 MAb en linfoma de células grandes y Panel D) Lym-1 MAb en linfoma de células pequeñas. (Paneles E-H) Las imágenes muestran la unión selectiva de SHAL JP459B a células Raji vivas (Panel E), pero no a las líneas de células no de linfoma LnCAP (Panel F), 22RV (Panel G) o DU145 (Panel H). La Figura 17B muestra que SHAL JP459B se une únicamente a células tumorales cultivadas vivas que contienen HLA-DR10. , las placas se recubren con estreptavidina hasta el día siguiente, se lavan y se añade el SHAL, se incuban durante dos horas y, a continuación, se lavan de nuevo para retirar el SHAL no adherido. A continuación se añaden las células. Las células se lavan y se tiñen con Cresyl Violet.

30 La Figura 18 muestra una sección de tejido de linfoma NH que ilustra que la tinción con JP459B de las células de linfoma se localiza en la membrana celular.

La Figura 19 ilustra una biodistribución ¹¹¹In-DOTA [SHAL 070804(LeacPLD)₂LPDo] en ratones con tumores en Raji.

45 La Figura 20 ilustra la unión de SHAL bidentado univalente y SHAL bidentado bivalente 070804LeacPLDB a células Raji en presencia y ausencia de anticuerpo Lym-1.

La Figura 21 ilustra diversas clases de dianas SHAL.

50 La Figura 22 ilustra SHAL unidos a DOTA. La parte roja es un ligando (desoxicolato), la verde es el otro ligando (5-leu-encefalina), la azul es una lisina utilizada para producir el enlace más corto, y la negra es una combinación de cosas: las moléculas PEG empleadas para alargar el enlace entre los dos ligandos, un anillo DOTA unido a SHAL para unir el metal radioactivo.

La Figura 23 muestra fórmulas para SHAL JP7001.2 y triyodotironina-desoxicolato.

55 Las Figuras 24A y 24B muestran estructuras químicas en dos dimensiones y acrónimos para el SHAL tridentado (Figura 24A) DvLPLLCTPCbPLDo; (dabsil-L-valina PEG lisina lisina 3-(2-([3-cloro-5-trifluorometil]-2-piridinil]oxi)-anilino)-ácido 3-oxopropanionico PEG 4-[4-(4-clorovencilo)piperazino]-3-ácido nitrobenzencarboxílico lisina-DOTA con el ligando Ct (Figura 24Ainsert); y el SHAL tridentado dimérico (Figura 24B) (DvLPLLCTPCbPPP)₂LLDo; ((dabsil-L-valina PEG lisina lisina 3-(2-([3-cloro-5-trifluorometil]-2-piridinil]oxi)-anilino)-3-ácido oxopropaniónico PEG 4-[4-(4-clorobencil)piperazino]-3-ácido nitrobenzencarboxílico PEG PEG PEG)₂ lisina lisina- DOTA. En diversas realizaciones, los SHAL

biotinilados análogos difieren únicamente con respecto a la sustitución de biotina para el quelato DOTA, en la parte superior derecha de cada SHAL.

Las Figuras 25A y 25B ilustran estructuras de SHAL dimérico SHAL (DvLPBaPPP)₂LLDo (Figura 25A) y el análogo de hexa-arginina(DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo (Figura 25B).

- 5 Las Figuras 26 ilustran la unión de SHAL radioetiquetado ¹¹¹In (DvLPBaPPP)₂LLDo y su análogo de hexa-arginina (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo a células Raji. Total ¹¹¹In- (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo unidos a células Raji (sin lavar), cuadrados coloreados; total ¹¹¹In-(DvLPBaPPP)₂LLDo unidos a células Raji (sin lavar), cuadrados sin colorear. Los pellets celulares que contenían 10⁶ células fueron resuspendidos en 150µl de solución tampón 5%BSA/PBS que contenía 0-25ng de SHAL ¹¹¹In etiquetado y se incubaron en RT durante una hora. Las muestras se centrifugaron para separar las células del supernatante y ambas se contaron en un contador de pocillos gamma calibrado para cuantificar los SHAL unidos y no unidos. Se incluyen barras de error para cada punto de datos, aunque en la mayoría de los casos el error es inferior al punto de datos y la barra de error no es visible.

- 15 La Figura 27 muestra la microscopía confocal en 3-D fluorescente de la unión de SHAL matriz (DvLPBaPPP)₂LLDo (fila superior) a células Raji vivas en comparación con el análogo de hexa-arginina (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo (fila media). Se muestran los dos planos focales de media célula en las células Raji (izquierda a derecha). Las células de Jurkat tratadas con (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo (panel izquierdo, fila inferior) muestran una absorción de SHAL mínima. Lym-1 (panel derecho, fila inferior) muestra principalmente la unión de la membrana de superficie celular a células Raji. El SHAL matriz muestra unión intracelular, mientras que el análogo de hexa-arginina demuestra no solamente

la unión citoplásmica marcada, sino también orientación intranuclear. DAPI se utiliza como tinción nuclear y AlexaFlor 610 demuestra la ubicación de SHAL en estas imágenes con láser secuencial fusionadas.

- 25 Figura 28. La estructura del SHAL tridentado que contiene el ligando Ct mostrado como una estructura esquemática en 2D (arriba) y como una estructura molecular en 3D con los espacios rellenos (abajo). Los ligandos utilizados para producir este SHAL fueron dabsil-L-valina (Dv), 4-[4-(4-clorobencilo)piperazina]-ácido 3-nitrobencencarboxílico (Cb) y (3-(2-([3-cloro-5- trifluorometil]-2-piridinil]oxi)-anilino)-ácido 3-oxopropanionico) (Ct). El primer residuo de lisina proporcionó una amina libre para la unión covalente de fracciones como macrociclos de unión a metales y biotina. Se utilizaron otros residuos de lisina para crear puntos ramificados en el enlazador y se utilizaron monómeros PEG para proporcionar la distancia adecuada entre los ligandos. Los tres ligandos se identificaron por docking en las cavidades en la subunidad beta de HLA-DR10, donde el hecho de flanquear el aminoácido arginina 70 resultó crítico para la unión de Lym-1 y la citotoxicidad. Se pueden incorporar moléculas funcionales en posiciones concretas a lo largo del enlazador, insertando residuos de lisina adicionales y uniéndolos a la amina épsilon libre de la lisina primaria.

- 35 Figura 29. Titulación de la actividad citotóxica de SHAL en HLA-DR10 humano en la línea celular Raji expresando células de linfoma. El número absoluto de células no viables se observó 1, 2 o 3 días después de la adición de SHAL a las concentraciones mostradas. A los dos días se determinó que el umbral de SHAL y las concentraciones de IC₅₀ eran de 0,7 y 2,5 nM (medios pm/ml), respectivamente (media ± desviación típica).

- 40 Figura30. Prueba fotográfica de curación en un ratón con un xenoinjerto de Raji; antes del tratamiento con SHAL (arriba), una semana después de la dosis inicial y de una segunda dosis de 100 ng de SHAL intraperitoneal (i.p.). Tres semanas después de la dosis inicial, el xenoinjerto había experimentado una regresión completa, lo que representó una curación que persistió durante el periodo de observación del ratón (>84 días; más bajo).

- 45 Figura31. Efecto de supervivencia total del SHAL en ratones con xenoinjertos de linfoma de Raji o Jurkat establecidos. Los ratones con xenoinjertos de Raji o Jurkat fueron tratados con 100 ng de SHAL i.p., una vez a la semana durante tres semanas consecutivas, o no recibieron tratamiento alguno. Los ratones con xenoinjertos de Raji (círculo coloreado) presentaron la supervivencia más prolongada, mientras que los ratones con xenoinjertos de Jurkat tratados (cuadrado) no sobrevivieron más de 56 días. Dos ratones no tratados (círculo vacío) con xenoinjertos aumentando de tamaño sobrevivieron 84 días.

- 50 Figura 32. Micrografías de electrones de los xenoinjertos de Raji realizadas con un ratón no tratado y un ratón 24 horas después del tratamiento con SHAL. Las estructuras celulares fueron normales para este xenoinjerto agresivo, no tratado (izquierda), mientras que las células del xenoinjerto tratado con SHAL presentaban una cromatina condensada y fragmentada y pérdida de estructuras citoplásmicas coherentes con la muerte autofágica (derecha) (barra, 5 µm).

Descripción detallada

- Esta invención se refiere al desarrollo de una nueva clase de moléculas de unión definidas en las reivindicaciones, que se pueden utilizar para la unión específica a prácticamente cualquier molécula diana. Esta clase de moléculas de unión se denominan en el presente ligandos de alta afinidad selectivos polidentados (SHAL). Los SHAL se pueden utilizar de manera análoga a los anticuerpos en una amplia

variedad de contextos, entre los que se incluyen, entre otros, para capturar reactivos en columnas de afinidad para la purificación de materiales biológicos o de otro tipo, como agentes de unión en biosensores, agentes para la unión de nanopartículas o nanomáquinas, con fines de diagnóstico y terapéuticos.

5 Los SHAL también se pueden utilizar para detectar firmas moleculares que pueden distinguir entre diversos tipos de patógenos o cepas. Los SHAL también se pueden utilizar en aplicaciones de biodefensa para la detección de firmas proteicas únicas presentes en toxinas y en las superficies de organismos patógenos, así como para distinguir estos agentes de bioamenaza de los materiales no peligrosos naturalmente presentes. Dado que los SHAL pueden ser relativamente estables cuando se exponen al
10 entorno, resultan particularmente adecuados para el uso en biosensores para aplicaciones de biodefensa y diagnóstico, entre otras.

En determinadas realizaciones preferibles, los SHAL están diseñados para ser utilizados en el diagnóstico y/o tratamiento del cáncer. En estas realizaciones, los SHAL están dirigidos a puntos únicos y/o específicos (por ejemplo, marcadores específicos del cáncer) que se encuentran en las superficies de las
15 células cancerosas (por ejemplo, diversas células malignas).

En determinadas realizaciones, los SHAL pueden tener un efecto terapéutico cuando se administran *per se* (por ejemplo, de manera análoga al terapéutico con anticuerpos Herceptin™). Un SHAL, como un anticuerpo, puede tener un efecto directo sobre una célula maligna que provoca la muerte celular, porque el SHAL actúa como agonista contra una vía normal, iniciando así o bloqueando funciones celulares
20 críticas y causando la muerte de la célula maligna. Un SHAL también puede actuar como una vacuna porque facilita la identificación de la célula maligna, bien porque representa un marcador de superficie celular anómalo o porque intensifica un marcador habitual de las células malignas.

Adicional, o alternativamente, el/los SHAL se pueden utilizar como diana (cuando se unen a la célula diana) o como vehículos (fracciones de unión) para otros efectores, entre los que se incluyen, entre otros, agentes como agentes citotóxicos, marcadores para la identificación por el sistema inmunitario, etiquetas detectables (para la captura de imágenes) y similares.
25

Los radioisótopos son ejemplos atractivos de efectores citotóxicos que se pueden unir al vehículo SHAL para administrar una radioterapia selectiva a la célula o células malignas.

30 Esta terapia se puede administrar en forma de terapia de agente único o en combinación con reconstitución medular, a fin de conseguir una mayor intensidad de la dosis, u otros fármacos que puedan mejorar los efectos de la radiación de la célula maligna. A pesar de que existen múltiples fármacos diferentes, quimioterapéuticos y biológicos entre otros, que se pueden combinar con el SHAL, los taxanos son un ejemplo atractivo.

Entre los ejemplos de agentes citotóxicos se incluyen radioisótopos, inmunotoxinas, quimioterapéuticos, inhibidores de enzimas, biológicos, etc. Entre los ejemplos interesantes se incluyen las señales apoptóticas y enzimas como las caspasas. Los radioisótopos representan agentes citotóxicos interesantes que han demostrado ser efectivos conjuntamente con sistemas de anticuerpo-antígeno y ligando-receptor. A efectos de tratamiento, de acuerdo con la presente invención, se considera que, en algunas realizaciones, es preferible etiquetar con un emisor de partículas como beta-, beta + (positrón). En algunos casos resulta apropiado etiquetar con un emisor alfa o emisor de electrones Auger. Existen múltiples ejemplos de radioisótopos terapéuticos, incluyendo el itrio-90 o yodo-131 que generan un gran interés en la actualidad.
40

Para determinados propósitos de captura de imágenes, de acuerdo con la presente invención, se considera que el tecnecio-99, indio-111, yodo-123 o yodo-131 resultan atractivos para la captura de imágenes de fotón único, mientras que es probable que los emisores beta+ (positrones) como el cobre-64, itrio-86, galio-68, etc., resulten particularmente atractivos cuando se unen a un SHAL con fines de diagnóstico.
45

Un SHAL se compone de dos o más ligandos (también denominados fracciones de unión) que se unen directamente o a través de un enlace para generar una molécula "polidentada" core (SHL) que ha sido diseñada para unirse de forma específica a prácticamente cualquier diana deseada (por ejemplo, puntos únicos o específicos (hendiduras) de una molécula de superficie de una célula maligna diana). Los ligandos (fracciones de unión) que comprenden el SHAL pueden incluir básicamente cualquier fracción capaz de unirse a un punto de la diana. Estas fracciones de unión pueden incluir, entre otros, diversos químicos (por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas), proteínas, azúcares, carbohidratos, lectinas, lípidos, metales, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos y peptídicos, y similares.
50
55

Aunque no es necesario, los ligandos individuales que comprenden el SHAL a menudo presentan una afinidad relativamente baja (por ejemplo, inferior a aproximadamente 10^{-6} M) con la diana. Por el contrario, el SHAL polidentado (que comprende una pluralidad de ligandos) típicamente muestra una avidéz relativamente alta (por ejemplo, mayor que 10^{-6} M, preferiblemente mayor que 10^{-8} o 10^{-9} o 10^{-10} M, más preferiblemente mayor que 10^{-11} M, y todavía más preferiblemente mayor que 10^{-12} M, aproximadamente).
60

En determinadas realizaciones, donde la diana a la que se va a dirigir el SHAL es una proteína, los

ligandos que comprenden el SHAL se pueden seleccionar para unirlos a determinados puntos no-funcionales de la proteína. Normalmente una proteína tiene una serie (algunas más de 50) de "hendiduras" o cavidades distribuidas por su superficie. Estas cavidades se producen cuando la proteína se pliega en una estructura tridimensional para hacer la proteína funcional. Esta observación permite plantearse el diseño de SHAL que exhibe una especificidad de unión mucho mayor para una proteína determinada de lo que se podía hasta ahora. Al unir dos fracciones que se unen a hendiduras únicas de la superficie de una proteína solo con afinidades micromolares, resulta posible diseñar moléculas polidentadas (SHAL) que se unen con afinidades nanomolares a picomolares y que son altamente selectivas y no presentan reacciones cruzadas con otras moléculas relacionadas funcionalmente. En el caso de las proteínas con una estructura conocida o predicha, se pueden utilizar métodos computacionales para generar un mapa tridimensional de la superficie molecular e identificar hendiduras de un tamaño adecuado que sean estructuralmente únicas para esa proteína tal y como se ha descrito en el presente.

Se puede realizar una selección en bases de datos que contienen las estructuras de moléculas pequeñas conocidas para determinar su capacidad para unirse a hendiduras de la proteína diana utilizando un programa "docking". A continuación, se puede someter a ensayo a los principales candidatos utilizando diversas técnicas experimentales, como las descritas en el presente, para identificar las moléculas que realmente se unen a la proteína, así como aquellas que no se unen al punto correcto. Los pares o tripletes de ligandos (por ejemplo, uno de cada grupo) se pueden unir a continuación a los extremos opuestos de un enlace de longitud adecuada, utilizando un químico en fase de solución o sólido para generar SHAL bidentados (Figura 1) o SHAL tridentados. A continuación, los SHAL con una afinidad más elevada y más selectivos se pueden identificar realizando estudios de unión convencionales.

Resultó sorprendente descubrir que la unión de dos o más ligandos pequeños que se unen ligeramente a la diana (por ejemplo, una proteína) y que presentan una selectividad escasa o insuficiente puede resultar en la producción de una molécula que se une a su diana prevista (por ejemplo, una proteína diana) con una magnitud entre tres y seis veces mayor y con elevada selectividad.

Sin ánimo de limitarse a una teoría concreta, se cree que a pesar de que cabría esperar que la presencia de dos o más ligandos en el SHAL aumente las probabilidades de que la molécula se pueda unir a una variedad más amplia de proteínas, hemos observado que esta unión noespecífica es débil (aproximadamente la misma que en el caso del ligando libre) y las moléculas unidas a proteínas no diana solo a través de uno de los ligandos no permanecerán unidas durante mucho tiempo. La afinidad y selectividad mejoradas observadas cuando los dos ligandos de un SHAL bidentado o todos los ligandos que comprenden un SHAL polidentado se unen a sus respectivas dianas (por ejemplo, a las hendiduras de una proteína diana) se debe a tres factores que están relacionados con la naturaleza de la interacción SHAL-diana: En primer lugar, la presencia del enlace impide que los ligandos individuales que comprenden el SHAL que se disocian de su diana se aparten de la superficie diana, aumentando de forma notable la cantidad de ligandos libres que se vuelven a unir. En segundo lugar, la reducción de la tasa de liberación del SHAL bidentado o polidentado viene dada por el hecho de que la probabilidad de que los dos ligandos (o todos) que comprenden el SHAL se liberen de forma simultánea de su diana es notablemente inferior que la probabilidad de que se libere uno. La separación entre los ligandos que comprenden el SHAL, que viene determinada por el químico de unión (por ejemplo, el enlazador), permite que los ligandos que comprenden el SHAL se unan simultáneamente a su diana únicamente cuando los ligandos están separados por la distancia correcta. Si algún ligando del SHAL se une independientemente a otra diana, su escasa afinidad (una afinidad micromolar de 1-10 es la típica en los ligandos que identificamos) provocaría que el ligando se desprendiese rápidamente (la tasa de liberación sería elevada). Por tanto, la única situación en la que el SHAL bidentado o polidentado se uniría estrechamente a la diana prevista (afinidad nanomolar o superior) sería aquella en la que los dos ligandos que comprenden el SHAL se unen simultáneamente a la molécula diana (por ejemplo, proteína diana). Una vez que los dos ligandos o todos ellos se han unido, la tasa de liberación de la molécula entera (el SHAL) se reduciría de forma drástica. Si se seleccionan correctamente los puntos de unión del ligando (por ejemplo, seleccionando regiones con diferentes secuencias de aminoácidos o estructuras en el caso de una proteína diana), resulta altamente improbable que se encuentren puntos idénticos en otra diana separada por la misma distancia. Si se diese este hecho extremadamente improbable, se puede identificar un punto de unión adicional del ligando (por ejemplo, un tercer punto de unión adyacente al Punto 1 y al Punto 2), y se puede incorporar un ligando adicional al SHAL (por ejemplo, para crear un SHAL tridentado, cuatridentado, etc.).

Los SHAL ofrecen ciertas ventajas respecto a los anticuerpos, particularmente en aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico. Típicamente, los SHAL tienen un tamaño significativamente menor que los anticuerpos. Por consiguiente, pueden conseguir una mayor penetración en el tumor. En determinadas realizaciones, también son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, por ejemplo para el tratamiento de tumores cerebrales. Se cree que los SHAL también suelen ser menos inmunogénicos que los anticuerpos y a menudo se eliminan de la circulación más lentamente.

En determinadas realizaciones, los SHAL descritos en el presente son típicamente polidentados, es decir que el SHAL comprende dos o más ligandos, que se unen directamente o través de uno o más

enlazadores. En determinadas realizaciones, los ligandos se unen a diferentes partes de la diana (por ejemplo, diferentes epítomos de una única proteína) a la que va dirigido el SHAL. En determinadas realizaciones, los ligandos se unen a diferentes moléculas, por ejemplo diferentes marcadores del cáncer de una célula cancerígena, a diferentes proteínas que comprenden un receptor y similares. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar SHAL poliespecíficos para la reticulación del mismo o diferentes antígenos de la misma célula, mejorando así la transducción de la señal, o para una preselección de la diana, por ejemplo cuando un SHAL está diseñado para focalizar células malignas y está unido a otros SHAL diseñados para "atrapar" un vehículo administrado posteriormente de un agente citotóxico (por ejemplo, radiometal quelado, etc.), para llevar una célula inmunológicamente activa (por ejemplo, un macrófago, célula T, etc.) al punto, para activar un profármaco en el SHAL focalizado, etc.

En determinadas realizaciones, esta "especificidad múltiple" se consigue mediante el uso de SHAL polivalentes. Los SHAL polivalentes son moléculas en la que se unen dos o más SHAL (por ejemplo, dos o más SHAL bidentados). Los diferentes SHAL que comprenden el SHAL polivalente se pueden dirigir a la misma diana o a dianas diferentes, por ejemplo como se ha descrito anteriormente.

15 (a) **Construcción de los SHAL**

Los SHAL de esta invención se crean identificando ligandos (fracciones de unión) que se unen, y en algunas realizaciones se unen específicamente (o preferencialmente), a diferentes regiones de la molécula o moléculas diana. Los ligandos que se unen a diferentes regiones de las moléculas diana se unen a continuación directamente o a través de un enlazador para producir un SHAL bidentado que comprende dos fracciones de unión diferentes o un SHAL polidentado que comprende dos o más fracciones de unión diferentes. A continuación el SHAL se puede seleccionar por su capacidad para unirse a la diana prevista.

La identificación inicial de ligandos que se unen a diferentes regiones de la diana se puede realizar utilizando métodos *in silico* virtuales (por ejemplo, métodos computacionales) y/o métodos empíricos, por ejemplo como los descritos en el presente.

Una vez que se han identificado dos o más ligandos adecuados (fracciones de unión), pueden, opcionalmente, ser seleccionados (validados) por su capacidad para unirse a la diana en diferentes puntos.

A continuación, los ligandos de unión adecuados se pueden unir directamente o a través de un enlace para formar un SHAL bidentado o polidentado que después se puede seleccionar, opcionalmente, por su capacidad para unirse a la diana.

A) Selección de la diana

Virtualmente cualquier molécula, receptor o combinación de moléculas puede servir de diana para un SHAL (véase, por ejemplo, la Figura 21). La selección de la diana viene determinada por la aplicación para la que está previsto utilizar el SHAL. Así, por ejemplo, cuando el SHAL se va a incorporar a una columna de afinidad (por ejemplo, para purificar una proteína o ácido nucleico), la diana es la molécula (por ejemplo, proteína, ácido nucleico, etc.) que se va a purificar utilizando la columna de afinidad que comprende el SHAL.

Cuando se va a utilizar el SHAL en el tratamiento y/o diagnóstico de un cáncer, la diana es típicamente una molécula, colección de moléculas, receptor, enzima u otra estructura característica del cáncer (por ejemplo, que permite que el SHAL se una preferentemente a la célula cancerígena con respecto a una célula sana normal).

Los expertos en la técnica conocen los diversos marcadores específicos del cáncer.

Estos marcadores incluyen, entre otros, el epítomo Lym-1, Muc-1, C-myc, p53, Ki67, erbB-2, Her2, Her4, BRCA1, BRCA2, Lewis Y, CA 15-3, G250, el antígeno de superficie celular HLA-DR, CD2, CD3, CD7, CD19, CD20, CD22, integrina, EGFr, AR, PSA, antígeno carcinoembrionario (CEA), el antígeno de superficie celular L6 (véase, por ejemplo, Tuscano *et al.* (2003) *Neoplasia*, 3641-3647; Howell *et al.* (1995) *Int J Biol Markers* 10:126-135; Marken *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:3503-3507, 1992), receptores del factor de crecimiento y/o diversas dianas intracelulares (por ejemplo, receptores, ácidos nucleicos, fosfoquinasas, etc.) y similares.

En determinadas realizaciones, se pueden generar SHAL para proteínas diana de la membrana de la superficie celular que influyen en funciones intracelulares, promoviendo así estas funciones (agonista) o inhibiendo estas funciones (antagonista) al bloquear otra unión molecular o causar una señal intracelular inhibitoria o mejorada, como señales de fosfoquinasa.

Los SHAL se pueden generar para proteínas diana de la membrana de la superficie celular, tales como antígenos y anticuerpos que se pueden internalizar en la célula. Al igual que los anticuerpos que focalizan la interiorización de antígenos y los ligandos peptídicos que focalizan la interiorización de receptores, estos SHAL serán interiorizados en la célula en la que pueden tener efectos agonistas o antagonistas sobre funciones celulares críticas como protooncogenes, fosfoquinasas, lisosomas y ADN/ARN/ARNm por

sus funciones agonistas o antagonistas o porque administran una carga de toxina o radioisótopo. Los SHAL apuntan varias ventajas con respecto a los anticuerpos y ligandos peptídicos. Tienen un tamaño pequeño y el rango de carga que se puede utilizar para permitir el libre movimiento hacia y en el interior de la célula cuando una molécula intracelular es la diana principal.

- 5 Los SHAL se pueden utilizar para seleccionar preferentemente células específicas por las dianas de su membrana y, tras la disociación de la membrana de la superficie celular diana pueden moverse libremente a través de la membrana de la superficie celular para acceder al interior de la célula. Se puede producir un SHAL multiespecífico de forma que cuando se internalice, o cuando se disocie y penetre por la membrana de la superficie celular, la segunda especificidad pueda permitir la focalización de las moléculas internas
- 10 de la célula, como fosfoquinasas, enzimas liposomales, receptores de hormonas, productos proteicos de un gen y protooncogen, ADN/ARN/ARNm y similares. En determinadas realizaciones, se pueden generar SHAL uniespecíficos pero multivalentes enfocados a las moléculas de la superficie celular y, al mismo tiempo, y reticular estas moléculas dando lugar a los efectos biológicos mejorados que han sido descritos para los sistemas reticulados antígeno-anticuerpo.
- 15 A diferencia de los anticuerpos y ligandos peptídicos que típicamente no se pueden penetrar directa y fácilmente en las membranas de la superficie celular, debido al pequeño tamaño de los SHAL, y la capacidad para seleccionar el carácter hidrófobo o hidrófilo del SHAL, se pueden producir SHAL capaces de penetrar en la membrana celular y diversos compartimentos intracelulares. Esto hace que resulte posible generar SHAL específicamente al objeto de llegar hasta moléculas intracelulares de importancia para la función celular, como protooncogenes, fosfoquinasas, enzimas lisosomales y otras enzimas,
- 20 ADN/ARN/ARNm, etc. Esta capacidad hace posible focalizar todas las clases de moléculas intracelulares de importancia crítica para la función celular, una capacidad que previamente no se podía conseguir por moléculas diana específicas. Además de dirigir los efectos de estos SHAL, se pueden utilizar como vehículos de cargas como las que se describen en el presente documento.
- 25 Los productos de protooncogenes son un ejemplo de una clase de dianas intracelulares a las que se pueden focalizar los SHAL y generar un efecto útil en el tratamiento del cáncer. Cabe señalar que las proteínas Ras, codificadas por protooncogenes, han actuado como dianas *in vitro* por los anticuerpos inyectados en las células y este bloqueo ha dado lugar a células que ya no se dividen. La mutación se ha relacionado con una actividad de control mermada de estos productos.
- 30 Muchas vías de señalización son susceptibles de interferencia al focalizar el SHAL en un paso (directamente intracelular) o dos pasos (focalización de membrana seguida por internalización) de las moléculas intracelulares. Estas incluyen, entre otras, vías fundamentales como señales de proteína "G" y la actividad de proteína quinasa específica de tirosina, como EGFR, Neu, etc. Las múltiples intervenciones del receptor de hormonas también se pueden focalizar por los SHAL para crear un cambio en la función celular y/o el crecimiento celular. Se puede producir la unión a dianas de hormonas o enzimas y bloquearse la función. Los bloqueos del receptor de hormonas que pueden resultar útiles incluyen el uso de SHAL para bloquear la unión de moléculas similares al ER (receptor de estrógeno) y efectos similares al AR (receptor de andrógeno). Esto a su vez interferiría con la unión de ADN del complejo, con la interferencia resultante en la viabilidad y el crecimiento de las células tumorales sensibles a hormonas.
- 35 Esta divulgación también contempla el uso de SHAL para tratar enfermedades infecciosas (por ejemplo, SIDA, gripe, etc.) mediante la unión primaria del agente infeccioso y/o mediante bloqueo de la invasión celular, y/o mediante el bloqueo de vías metabólicas críticas para la propagación del agente infeccioso (por ejemplo, bloqueando CCR5 para evitar la infección VIH de las células).
- 40 Cuando la diana a la que está dirigido el SHAL comprende una proteína, en determinadas divulgaciones, al menos uno de los ligandos (fracciones de unión) que comprende el SHAL se une a una hendidura de la proteína. En determinadas divulgaciones, al menos dos de las fracciones de unión que comprenden el SHAL se unen a hendiduras de la proteína y estos dos ligandos se unen a hendiduras diferentes. En determinadas divulgaciones, todos los ligandos que comprenden el SHAL se unen a hendiduras en la proteína diana. Esto no sugiere que todos los ligandos que comprenden el SHAL se deban unir a hendiduras de proteínas. Se contemplan determinadas divulgaciones donde un ligando se une a una hendidura y otro ligando se une a una región que no es una hendidura o en las que ninguno de los ligandos se unen a una hendidura.
- 45 Cuando no se dispone de información estructural para una diana concreta (por ejemplo, un marcador del cáncer o un dominio o epítipo dentro de un marcador cancerígeno), entonces la diana o dominio dentro de la diana se puede modelar para identificar puntos de unión de ligandos para el diseño de un SHAL para esta diana específica. Si la diana se ha caracterizado estructuralmente, entonces la estructura cristalina o NMR de las moléculas relacionadas se puede utilizar de esta manera. En caso de que no se disponga de información, una circunstancia menos usual, se pueden emplear enfoques empíricos para identificar los ligandos adecuados para la construcción de un SHAL como el descrito aquí.
- 50 Los planteamientos empíricos descritos aquí también se pueden utilizar para acelerar el proceso de desarrollo del SHAL. En esta circunstancia, la elaboración de modelos y otros pasos analíticos se pueden realizar tras el desarrollo empírico de un SHAL deseado para comprender mejor el SHAL y/o para guiar las generaciones posteriores de desarrollo del SHAL.
- 60

Aunque los ejemplos ilustran una realización preferible en la que el SHAL

está previsto como vehículo para la captura de imágenes y radioisótopos terapéuticos, como indio-111 e itrio-90, para el diagnóstico y tratamiento, y la diana prevista es la molécula de superficie celular HLA-DR que se encuentra en linfocitos B malignos y normales, y por tanto resultan útiles en la mayoría de los linfomas y leucemias, cabe señalar que esta es solo una de las múltiples realizaciones incluso por lo que respecta a las leucemias y linfomas de células B. Por ejemplo, se conocen anticuerpos para identificar varios otros antígenos de superficie celular que resultan atractivos para actuar sobre leucemias y linfomas de células B. Estos también se podrían utilizar para los mismos fines y de la misma manera que los del HLA-DR. También es interesante señalar que la región focalizada por los SHAL diseñados para actuar sobre el HLA-DR se encuentra en el área de la fosa conocida para la presentación del péptido de importancia para la identificación inmunitaria y el rechazo. Más importante aún es que los antígenos y epítomos han sido caracterizados y se ha demostrado que son importantes para la focalización de anticuerpos de adenocarcinomas de todo tipo, incluyendo patologías malignas de mama, próstata y colon. Las mucinas aberrantes de los adenocarcinomas y los CEA encontrados abundantemente en múltiples adenocarcinomas también proporcionan dianas atractivas que han sido bastante bien caracterizadas.

En determinadas realizaciones, se cree que la repetición en tándem de la proteína core de la mucina (MUC1) (véase, por ejemplo, la Figura 4) proporciona una buena diana para los SHAL focalizados al cáncer. Se ha demostrado que MUC-1 se regula al alza y se encuentra fácilmente presente en cánceres epiteliales, como cáncer de próstata, mama, colon y ovarios (véanse, por ejemplo, las Figuras 5, 6 y 7).

La radioinmunoterapia (RIT), usando Y-90 en una serie de anticuerpos monoclonales (mAbs), incluyendo aquellos contra MUC-1, ha demostrado resultados prometedores en estudios preclínicos y ensayos con pacientes. Estos estudios han demostrado que se pueden focalizar eficazmente los cánceres epiteliales utilizando mAbs radioetiquetados y que MUC-1 es una de las dianas más atractivas. Sin embargo, los anticuerpos completos no se concentran fácilmente y por lo general no penetran en los cánceres sólidos. Por consiguiente, el índice terapéutico para estas fracciones ha resultado ser relativamente bajo.

Sin embargo, se espera que los SHAL dirigidos a MUC-1 elaborados, por ejemplo, según los métodos descritos aquí, dirigidos contra la repetición en tándem de la proteína core de MUC-1, un epítipo que ha demostrado en estudios preclínicos y ensayos RIT en pacientes que es un epítipo antigénico único regulado al alza en cánceres epiteliales, resulten altamente efectivos. Los SHAL (ligandos de alta afinidad selectivos) son bastante pequeños (unos 2000 Daltons) en comparación con los anticuerpos completos (unos 150000 D) o incluso con fragmentos variables de cadena simple (25000 D), por lo que los SHAL penetran fácilmente y se concentran en los tumores malignos o son rápidamente eliminados o excretados por los riñones.

En determinadas realizaciones, se elige un ligando o ligandos adicionales, más allá de uno o dos elegidos para los puntos de docking en la región epitópica de interés, para los puntos de docking fuera de la región de interés de la diana. Esto proporciona una mayor selectividad y una afinidad "efectiva". En el caso de una diana multimérica, por ejemplo, HLA-DR, se pueden dirigir ligandos adicionales a la misma subunidad de la diana o a otra diferente. En concreto, en el caso del HLA-DR, se puede dirigir uno o dos ligandos a puntos de docking conocidos en la región epitópica definidos para la reactividad del anticuerpo monoclonal Lym-1 y se pueden elegir ligandos adicionales para los puntos de docking del mismo multímero o de otro diferente, por ejemplo, la subunidad beta o la subunidad alfa de HLA-DR.

Otros ejemplos son los SHAL con ligandos elegidos para reaccionar con repeticiones en tándem de mucinas, como MUC-1, tal y como se ha descrito anteriormente. En este ejemplo, la proteína core es repetitiva a intervalos de 10 mer para que los SHAL de naturaleza similar o idéntica se puedan unir para proporcionar enlaces multivalentes para repeticiones idénticas o similares pero diferentes de distancia conocida (o desconocida). Alternativamente, el SHAL puede tener un tercer ligando que es idéntico a uno de los ligandos iniciales pero unido a una distancia para el docking en puntos de una región remota de la repetición en tándem de la proteína core de MUC-1.

Asimismo, los puntos de docking pueden ser protrusiones además de cavidades, aunque estas últimas es probable que permitan una mayor afinidad en virtud del potencial de un mayor número de interacciones de contacto.

B)Compuestos (ligandos putativos/fracciones de unión) a seleccionar

Se puede seleccionar prácticamente cualquier agente por su capacidad para unirse a una diana y, por tanto, por su idoneidad para su incorporación a un SHAL según los métodos de esta invención. Entre estos agentes se incluyen, entre otros, ácidos nucleicos, proteínas/péptidos, análogos de ácidos nucleicos o péptidos, metales, azúcares, polisacáridos, glicoproteínas, lípidos, lectinas, moléculas orgánicas grandes y pequeñas, CDR de anticuerpos y similares.

En una divulgación preferible, los métodos de selección de alta producción implican proporcionar una biblioteca de química combinatoria que contiene un gran número de ligandos potenciales (fracciones de unión). Estas "bibliotecas de química combinatoria" se seleccionan después en uno o más ensayos, como se ha descrito aquí, para identificar los miembros de la biblioteca (especies químicas concretas o

subclases) que presentan la actividad de unión deseada. Los compuestos identificados de este modo pueden servir como componente de un SHAL.

Una biblioteca de química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica mediante combinación de una serie de "bloques de construcción" químicos como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca de química combinatoria lineal como una biblioteca de polipéptidos (por ej. muteína) se forma combinando un conjunto de bloques de construcción químicos denominados aminoácidos en todas las formas posibles para una longitud determinada del compuesto (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos a través de esta mezcla combinatoria de bloques de construcción químicos. Por ejemplo, un comentarista ha observado que la mezcla combinatoria sistemática de 100 bloques de construcción químicos intercambiables resulta en la síntesis teórica de 100 millones de compuestos tetraméricos o 10 000 millones de compuestos pentaméricos (Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.*, 37(9): 1233-1250).

La preparación de bibliotecas de química combinatoria es bien conocida por los expertos en la técnica. Estas bibliotecas de química combinatoria incluyen, entre otras, bibliotecas de péptidos (véase, por ej. la Patente USA 5 010 175; Furka (1991) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37: 487-493; Houghton *et al.* (1991) *Nature*, 354: 84-88). Las síntesis de péptidos no es ni mucho menos el único método previsto y pensado para ser utilizado con la presente invención. También se pueden utilizar otros procesos químicos para generar bibliotecas de diversidad química. Estos procesos químicos incluyen, entre otros, peptoides (Publicación PCT n° WO 91/19735), péptidos codificados (Publicación PCT WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (Publicación PCT WO 92/00091), benzodiazepinas (Pat. USA n° 5 288 514), diversómeros como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913), polipéptidos vinílogos (Hagihara *et al.* (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568), peptidomiméticos no peptídicos con estructura beta-D-glucosa (Hirschmann *et al.*, (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de pequeños compuestos (Chen *et al.* (1994) *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661), oligocarbamatos (Cho, *et al.*, (1993) *Science* 261:1303), y/o fosfonatos peptidílicos (Campbell *et al.*, (1994) *J. Org. Chem.* 59: 658). Véase, en general, Gordon *et al.*, (1994) *J. Med. Chem.* 37:1385, bibliotecas de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Strategene, Corp.), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, Patente USA n° 5 539 083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn *et al.* (1996) *Nature Biotechnology*, 14(3): 309-314), y PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang *et al.* (1996) *Science*, 274: 1520-1522, y la Patente USA 5 593 853), y bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum (1993) C&EN, 18 de enero, pág. 33, isoprenoides, Patente USA n° 5 569 588, tiazolidinonas y metatiazanonas, Patente USA n° 5 549 974, pirrolidinas, Patentes USA n° 5 525 735 y 5 519 134, compuestos de morfolino, Patente USA n° 5 506 337, benzodiazepinas 5 288 514 y similares).

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias se encuentran disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA).

En determinadas divulgaciones, la selección inicial de ligandos (fracciones de unión) con los que construir el SHAL se puede realizar mediante un método de selección *in silico* virtual y, en este caso, no es necesario disponer de los compuestos físicos. En tales casos las bases de datos de estructuras químicas proporcionan una amplia serie de fracciones que se pueden seleccionar por su idoneidad para ser incluidas en un SHAL como se ha descrito aquí.

Las bases de datos de estructuras químicas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el MDL® Available Chemicals Directory (MDL ACD) es actualmente la base de datos de búsqueda de estructuras de compuestos químicos comercialmente disponibles más grande del mundo y está disponible en MDL Information Systems, Inc., San Leandro, California. Esta base de datos se indica meramente a título enunciativo y sin carácter limitador. Otras bases de datos de estructuras químicas (por ejemplo, ChemSpider, ZINC, etc.) son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, entre otras, diversas bases de datos de estructuras de moléculas orgánicas, péptidos, carbohidratos o ácidos nucleicos.

C) Identificación computacional de ligandos que se unen a la diana

Utilizando un método *in silico* virtual, se pueden usar métodos computacionales para caracterizar (por ej. modelar) la diana (por ej. proteína diana) y para identificar moléculas (fracciones de unión) que se espera que se unan específicamente a determinadas regiones de la diana. El uso de métodos computacionales para identificar moléculas que se unen específicamente a una diana concreta se suele denominar "DOCKING".

Los métodos de docking son bien conocidos por los expertos en la técnica. Dos enfoques de docking son el "docking de molécula rígida" en el que las moléculas implicadas son tratadas como objetos rígidos que

no pueden cambiar su forma espacial durante el proceso de docking, y el soft docking (flexible), donde se permite que las moléculas (computacionalmente) cambien de forma mientras se produce el docking.

Hay diversas fuerzas físicas y químicas que interactúan entre las dos moléculas. Estas fuerzas se utilizan para definir diversas puntuaciones de docking que miden la calidad de cada solución. Estas puntuaciones tienen en cuenta la solidez de estas fuerzas y la viabilidad de la solución de docking. Las fuerzas más significativas típicamente consideradas en los algoritmos de docking incluyen fuerzas eléctricas, fuerzas van der Waals y enlaces de hidrógeno.

El problema del docking se suele manifestar formalmente como sigue: Suponiendo que A,B son dos moléculas rígidas (por ejemplo, la diana y el potencial ligando que se va a unir a la diana) con su representación geométrica en R³. Si queremos hallar una transformación rígida T:R³→R³ de forma que la superficie de contacto entre T-A y B es máxima. La superficie de contacto se define típicamente como la superficie en la que la distancia entre las moléculas es inferior a un determinado umbral. Típicamente los algoritmos de docking intentan alcanzar una superficie de contacto que sea "suficientemente grande" en lugar de "máxima" y que intentemos maximizar no el tamaño de la superficie de contacto sino una puntuación que mide la calidad de las soluciones de docking propuestas. Estos dos parámetros están correlacionados pero no son equivalentes.

1. Docking rígido

Un planteamiento para el algoritmo de docking rígido fue descrito por *Kuntz et al.* (1982) *J. Mol. Biol.*, 161: 269-288. El algoritmo de *Kuntz et al.* se utiliza principalmente para resolver el docking de ligando-proteína, al tiempo que se intenta centrar en puntos "de interés" sobre la superficie de las moléculas. Las fases básicas del algoritmo implican primero computar la superficie molecular utilizando el método de Connolly (véase, por ejemplo, Connolly (1983) *J. Appl. Crystallography*, 16: 548-558; Connolly (1983) *Science*, 221: 709-713). Esto produce una serie de puntos en la superficie molecular "alisada" con sus normales. Después se utiliza un "generador de esferas" (por ejemplo, SPHGEN) para crear una nueva representación de la superficie molecular de la diana (por ej. proteína) y el ligando utilizando "pseudoátomos" y después utiliza esta representación para encontrar puntos de docking viables sobre la superficie molecular — estos puntos de docking que busca SPHGEN son cavidades en la superficie del receptor.

SPHGEN normalmente se compone de las fases siguientes: En primer lugar, para cada par en los puntos de Connolly p_i, p_j , una esfera que pasa por este par se sitúa de forma que su centro se encuentre en uno de los puntos de la normal. El algoritmo a continuación define $S_{norm}(i) = \{ \text{Esferas cuyo centro se encuentra en la normal de } p_i \}$. Dando por supuesto que hay n puntos de Connolly, entonces para cada $1 \leq i \leq n$ y p_i se encuentra en la superficie de la diana, retiramos todas las esferas de $S_{norm}(i)$ y dejamos únicamente la que tiene el radio más pequeño. De este modo se retiran todas las esferas que penetran en la superficie de la diana. Entonces el algoritmo típicamente solo deja las esferas donde θ (por ej. el ángulo entre la p_i normal y el radio de p_j al centro de la esfera) $< 90^\circ$. De lo contrario, los puntos que definen la esfera, p_i y p_j , están demasiado cerca entre sí y, por tanto, no están ubicados en una cavidad de la superficie de la diana. A continuación el algoritmo típicamente para cada átomo deja únicamente la esfera con el radio máximo. Este paso deja únicamente las esferas que "tocan" la superficie del átomo. Por último, si los puntos que definen la esfera, p_i y p_j , pertenecen a dos átomos diferentes y la distancia entre estos átomos en la secuencia molecular es menor a 4- la esfera es descartada. Esto se hace porque la longitud de una curva de una hélice alfa es de 3,6 y estos puntos típicamente no son tratados como puntos de docking posibles.

Las restantes esferas se denominan pseudoátomos. La siguiente fase busca grupos de intersección de pseudoátomos. La existencia de este tipo de grupos indica la existencia de una cavidad en la superficie molecular, que se considera un buen punto para el docking.

Una vez realizado todo esto en la diana, se repite lo mismo con el ligando, pero esta vez tomamos los puntos y los vectores opuestos a sus normales, para crear las esferas dentro de la superficie y no fuera de la superficie. El resultado de SPHGEN en la diana a menudo se denomina la "imagen negativa" y en el ligando se denomina la "imagen positiva". En determinadas realizaciones, los vectores con respecto al ligando y a la diana se pueden invertir (por ejemplo, encontrar elementos de la diana que se acoplan en el interior de cavidades del ligando).

Entonces se realiza típicamente un "emparejamiento". En esta operación, para cada punto de docking, el algoritmo trata de encontrar una transformación T que ofrece una buena correspondencia entre los centros de los pseudoátomos de la diana y los del ligando (en algunos casos, se utilizan los centros de los átomos reales del ligando, en lugar de los centros de sus pseudoátomos). En algunas versiones de DOCK, los grupos de pseudoátomos se separan en subgrupos con el fin de mejorar la complejidad de esta etapa. Una forma de hacerlo consiste en descartar la esfera más grande del clúster, que en ocasiones causa que el clúster se divida en dos subclústeres.

En el problema del emparejamiento del docking rígido se realiza una búsqueda para encontrar una traslación y una rotación de una molécula, de manera que se forme un buen emparejamiento entre los puntos de interés de ambas moléculas. En determinadas realizaciones, las distancias entre el punto

utilizado en lugar de las ubicaciones de los puntos: Para cada molécula, la diana (T) y el ligando (L), se define una matriz de distancia apropiada – d^T_{ij} y d^L_{ij} , respectivamente. A continuación se realiza una búsqueda para intentar encontrar dos subconjuntos en T y L de forma que sus distancias sean las mismas, con cierta tolerancia de error. Estos dos subconjuntos definen dos subgráficos con unas distancias casi similares entre sus vértices. Esto se puede hacer utilizando un método similar al árbol de interpretación de Grimson y Lozano-Pérez.

Otra forma de resolver el problema de emparejamiento consiste en encontrar un grupo "lo suficientemente grande" en un gráfico de emparejamiento. Si hay n puntos en la diana y m puntos en el ligando, el gráfico de emparejamiento tiene n*m vértices donde cada vértice representa un punto de la diana y un punto del ligando. Supongamos que $G=(V,E)$ es el gráfico de emparejamiento y que u, v son los vértices en V, donde u representa u_L y u_T (puntos en el ligando y en la diana, respectivamente) y v representa v_L y v_T . Se añadirá un margen $e=(u,v)$ a E únicamente cuando $ABS [d^L(u_L,v_L) - d^T(u_T,v_T)] < \text{tolerancia}$. Por tanto, un grupo en el gráfico de emparejamiento define subconjuntos de puntos en el ligando y el receptor con distancias similares.

A fin de evaluar la calidad del emparejamiento se calcula una puntuación. La puntuación preferiblemente tiene en cuenta el tamaño de la superficie de contacto entre las moléculas y típicamente no permite que una molécula penetre en la otra. El algoritmo DOCK utiliza una cuadrícula cúbica que rellena el punto de unión y todas las células de esta cuadrícula tienen una puntuación en función de su distancia desde el centro de los átomos del receptor: 1 si la distancia es 2,8Å - 4,5Å, -127 si la distancia es inferior a 2,8 Å, y 0 si la distancia es superior a 4,5Å. (En algunos casos, la distancia 2,8Å es sustituida por 2,4Å). Para cada transformación propuesta, se calcula la posición de los puntos del ligando (es decir, los centros de sus átomos o pseudoátomos) en la cuadrícula y la puntuación viene determinada por la suma de las puntuaciones de estos puntos. Las diversas versiones del algoritmo pueden utilizar puntuaciones adicionales o alternativas. Por ejemplo, en una versión se puede calcular una puntuación de energía de van der Waals para las transformaciones que tienen buenas puntuaciones de emparejamiento.

Construcción de un modelo informático de HLA-DR10. Utilizando las estructuras cristalinas que se han determinado para cuatro moléculas de HLA-DR humano estrechamente relacionadas (HLA-DR 1-4), la identificación de "hendiduras" únicas en la superficie de la proteína, la identificación de ligandos que se unen a determinadas hendiduras únicas y la construcción de SHAL utilizando estos ligandos se ilustran en el presente en los ejemplos.

La anterior descripción tiene por objeto ilustrar un planteamiento para el docking rígido sin carácter limitador. Otros planteamientos son conocidos por los expertos en la técnica. Cabe señalar que los programas SPHGEN y DOCK están disponibles en el mercado (por ej., se pueden adquirir directamente en la Universidad de California y diversos fabricantes de software).

2. Soft Docking (flexible)

Los algoritmos de *soft docking* son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ej., Jiang y Kim (1991) *J. Mol. Biol.*, 219: 79-102; Katchalski-Katzir *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89(6): 2195-2199, *etc.*).

En el método descrito por Jiang y Kim, supra, se realiza una enumeración en el espacio

sexadimensional de la transformación rígida y se asignan puntuaciones a estas transformaciones en función de su valor energético. Ambas moléculas se colocan en una cuadrícula y se evalúa el emparejamiento utilizando las distancias entre las células de la cuadrícula, el número de penetraciones y las direcciones de las normales de los puntos. El algoritmo funciona con el producto del algoritmo de Connolly y en la totalidad de la superficie molecular (es decir no se buscan cavidades, a diferencia del algoritmo de DOCK). Para reducir la enumeración, el algoritmo utiliza típicamente dos resoluciones: baja y fina. La resolución baja utiliza unos 0,3 puntos por angstrom cuadrado y la fina aproximadamente 1 punto por angstrom cuadrado.

Cada célula de la cuadrícula es marcada como "superficie" (si contiene al menos un punto de Connolly) o como "volumen" (si no contiene ningún punto de Connolly). Habitualmente, cada célula de superficie contiene 2-3 puntos de Connolly.

Se realiza una enumeración sobre las rotaciones de una de las moléculas (normalmente la más pequeña). Para cada rotación se realiza lo siguiente: Se calcula la superficie y el volumen de la molécula. Suponiendo que hay al menos un par de células de superficie (una de cada molécula) y que son emparejadas por la transformación, se realiza una enumeración en todas estas parejas. Se calcula la transformación para cada pareja y se evalúa comprobando las direcciones de las normales, el número de parejas de superficie a superficie y el número de penetraciones. Las buenas transformaciones son aquellas que tienen un pequeño número de penetraciones y muchas parejas de superficie a superficie. Esto se hace primero a baja resolución y los mejores resultados se calculan de nuevo en resolución fina con la adición de una puntuación energética aproximada. La puntuación energética aproximada se calcula en función del número de interacciones "favorables" y "desfavorables". Hay varias categorías para los átomos de cada molécula y las combinaciones de estas categorías están marcadas como "favorables" si

realizan una buena contribución a la viabilidad energética del emparejamiento y como "desfavorables" en el caso contrario.

Por ejemplo, es desfavorable que un átomo con carga positiva se coloque cerca de otro átomo con carga positiva, pero es favorable si dos átomos son adyacentes y uno de ellos es un donador-H y el otro un aceptor-H.

El planteamiento de Katchalski-Katzir *et al.*, *supra*, consiste en realizar una enumeración sobre las posibles traslaciones, al tiempo que se utiliza el algoritmo FFT para calcular eficientemente la puntuación de emparejamiento. De forma similar a lo que ocurría con el algoritmo anterior, ambas moléculas se colocan en una cuadrícula tridimensional, pero aquí se definen tres tipos de células de la cuadrícula: "volumen", "superficie" e "intermedia". Si las moléculas son A y B, las matrices $A_{1,m,n}$ y $B_{1,m,n}$ se definen como sigue (l,m,n son las coordenadas de la cuadrícula): $A_{1,m,n} = \{ 1 - \text{si } (l,m,n) \text{ es una célula de "superficie"}, q - \text{si } (l,m,n) \text{ es una célula "intermedia"}, 0 - \text{de lo contrario}\}$, y $B_{1,m,n} = \{ 1 - \text{si } (l,m,n) \text{ es una célula de "superficie"}, r - \text{si } (l,m,n) \text{ es una célula "intermedia"}, 0 - \text{de lo contrario}\}$.

En determinadas divulgaciones, se seleccionan parámetros de forma que $q < 0$ y $r > 0$ mientras que $|q|$ es grande y $|r|$ es pequeño. El producto escalar de estas matrices se puede calcular de forma eficiente utilizando FFT, mejorando así el rendimiento del algoritmo considerablemente.

Una vez más, cabe señalar que la anterior descripción tiene por objeto ilustrar un planteamiento para el docking rígido sin carácter limitador. Otros planteamientos son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, otros planteamientos/programas incluyen, entre otros, los siguientes: FlexX de Tripos (<http://www.biosolveit.de/FlexX/>) que se utiliza habitualmente para la selección de alto rendimiento. Emplea una función de puntuación empírica. Permite el docking flexible girando alrededor de enlaces de torsión. Se comercializa como un módulo del programa Sybyl (distribuido por Tripos, Inc., St. Louis). GOLD de CCDC (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/prods/gold/>) que utiliza un algoritmo genético para generar los elementos que componen un ligando. Permite la personalización de la energía torsional dentro de fragmentos más pequeños de la molécula y admite la flexibilidad de la proteína local. Autodock UCSD (<http://www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock/>) utiliza un algoritmo genético de Lamarckian para generar los elementos que componen un ligando. AutoDock da mejores resultados cuando solamente hay unos pocos ligandos y las energías de unión necesitan ser más precisas. Algunas revisiones recomendables sobre Docking incluyen Lyne (2002) *Drug Discovery Today*, 7 (20): 1047, y Taylor *et al.* (2002) *J. Computer-Aided Mol. Design.*, 16: 151.

D) Planteamientos empíricos y verificación de la unión del ligando

El uso de métodos computacionales para identificar ligandos para su uso en la construcción de un SHAL requiere al menos cierta información relativa a la estructura de la molécula o las moléculas diana. Esta invención contempla asimismo el uso de métodos que no requieren conocimiento de la estructura de la diana a la que se va a dirigir el SHAL.

En determinadas divulgaciones "empíricas", se seleccionan los ligandos individuales o las bibliotecas de ligandos en función de las células y/o moléculas diana, bacterias, virus, etc., que presentan la molécula o moléculas diana, a fin de identificar los ligandos que se unen a la diana deseada (al menos con baja afinidad). Se identifican los ligandos que se unen a diferentes regiones de la molécula o las moléculas diana. En determinadas realizaciones, se identifican ligandos que se unen a diferentes regiones de las moléculas diana y que no se excluyen entre sí de esa unión.

Los ligandos que se pueden unir simultáneamente a la diana sin excluirse entre sí se pueden unir juntos, directamente o a través de un enlace, para crear un SHAL polidentado que puede, opcionalmente, ser seleccionado posteriormente por su capacidad para unirse a la molécula o moléculas diana, por ejemplo con una afinidad elevada.

Además de su uso en planteamientos empíricos para la identificación de ligandos, los métodos de selección físicos también resultan recomendables para validar la unión de los ligandos identificados utilizando los planteamientos *in silico* virtuales anteriormente descritos. También puede resultar recomendable determinar adicionalmente la orientación de la unión de dos o más ligandos, por ejemplo para confirmar que los ligandos se unen a diferentes puntos de la diana y/o calcular la separación cuando los ligandos se incorporan a un SHAL.

Los ensayos para detectar la unión de uno o más ligandos a una diana son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, los ligandos pueden ser etiquetados con una etiqueta detectable y ponerse en contacto con la molécula o moléculas diana que se encuentran inmovilizadas sobre un sustrato. Después de aplicar un lavado, la detección de las etiquetas en asociación con la molécula o moléculas diana inmovilizadas indica que los ligandos se unen a la diana. En determinadas realizaciones, se pueden etiquetar diferentes ligandos con diferentes etiquetas (por ejemplo, etiquetas fluorescentes de diferentes colores) para poder visualizar la unión simultánea de múltiples ligandos.

Alternativamente, se pueden realizar ensayos de unión competitiva. En estos ensayos, la molécula o moléculas diana se ponen en contacto con un ligando que se sabe que se une a la diana. La diana

también se pone en contacto con el ligando "de ensayo" y se evalúa la capacidad del ligando de ensayo para unirse a la diana en presencia del primer ligando.

5 También se pueden realizar ensayos en fase líquida. Por ejemplo, el ligando o ligandos y las dianas se pueden etiquetar con diferentes etiquetas. Los ligandos se pueden poner en contacto con la molécula o moléculas diana y se puede evaluar la unión de los dos fácilmente, por ejemplo utilizando una citometría de flujo. Los métodos de citometría de flujo son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Omerod (1994) *Flow Cytometry: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.; Shapiro Practical Flow Cytometry. 3ª Edición. Alan R Liss, Inc.; Givan (1992) *Flow Cytometry. First Principles*. Wiley-Liss, New York; Robinson (1993) *Handbook of Flow Cytometry Methods*, Wiley- Liss, Nueva York y similares).

10 La determinación de la unión del ligando y de su orientación también se puede realizar usando diferentes métodos. Entre ellos se incluye, entre otros, resonancia magnética nuclear (NMR) por diferencia de transferencia de saturación (Mayer y Meyer (1999) *Angew Chem Int Edit*, 38:1784-1788) y espectroscopia de NMR NOE de transferencia (trNOE) (Henrichsen *et al.* (1999) *Angew Chem Int Edit*, 38:98-102; Cosman *et al.* (2002) *Chem Res Toxicol* 15: 1218-1228). Estos métodos se pueden utilizar para seleccionar los ligandos en mezclas de varios a varios cientos por experimento para determinar qué ligandos se unen a la molécula o moléculas diana, por ejemplo en condiciones biológicamente relevantes, y para determinar qué ligandos se unen a los mismos puntos (o a puntos diferentes). También se pueden realizar experimentos de difusión (Lin *et al.* (1997) *J. Organic Chem.*, 62: 8930-8931) con aquellos ligandos para los que se ha determinado que se unen, a fin de valorar la afinidad de unión relativa de cada compuesto.

20 Otros planteamientos para detectar la unión de los ligandos a la molécula o moléculas diana incluyen, entre otros, la resonancia de plasmones superficiales (ensayo BIAcore), espectroscopia de resonancia magnética nuclear por diferencia de transferencia de saturación, otras mediciones de la espectroscopia de la resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, microarrays de captura, ensayos con bibliotecas basados en gránulos y otros ensayos de unión físicos.

25 Los anteriores ensayos se citan únicamente a título ilustrativo y sin carácter limitador. Utilizandolas enseñanzas proporcionadas en el presente, otros ensayos para detectar la unión del ligando a la molécula o moléculas diana serán conocidos por los expertos en la técnica.

30 Tras la identificación de un conjunto de ligandos que se unen a la molécula o moléculas diana (por ejemplo, HLA-DR10), se pueden realizar experimentos de competencia, por ejemplo mediante NMR, para determinar si se unen a una de las hendiduras que comprende la molécula o moléculas diana (por ejemplo, en el caso del HLA-DR10, a una de las hendiduras que comprenden el epítipo Lym-1.

35 Como se ha indicado anteriormente, esto se puede realizar fácilmente preparando un complejo entre la diana y un ligando de unión conocido, y determinando si un segundo ligando se puede unir al complejo. Así, por ejemplo, en el caso de la diana de HLA-DR10, se puede preparar un complejo de Lym-1/HLA-DR10 y el conjunto de ligandos que se unen a HLA-DR10 puede ser sometido a un nuevo ensayo para determinar si todavía se unirán a la proteína cuando el anticuerpo de Lym-1 se haya unido.

40 Los ligandos que ya no se unen al complejo Lym-1/HLA-DR10 pueden ser identificados (estos ligandos se unen a los puntos únicos que diferencian al HLA-DR10 de las demás moléculas del HLA-DR) y utilizados en un segundo juego de experimentos de competencia para identificar aquellas moléculas que se unen a diferentes puntos dentro del epítipo Lym-1. En experimentos realizados con pares de ligandos, los efectos Overhauser nucleares transferidos (trNOE) que se producen entre los ligandos unidos y la proteína de HLA-DR10 (Cosman *et al.* (2002) *Chem Res Toxicol* 15: 1218-1228), en ausencia del anticuerpo de Lym-1, pueden ser utilizados para identificar los ligandos que se unen a los mismos puntos y a puntos diferentes. Los ligandos unidos emiten señales NOE negativas, mientras que los ligandos no unidos presentan señales positivas (*Id.*). Si se observa que los dos ligandos de la pareja se unen a la proteína al mismo tiempo, los resultados indicarán que los dos ligandos se deben unir a puntos diferentes. Por tanto, la selección permite identificar fácilmente grupos de ligandos que se unen a diferentes puntos de la molécula o moléculas diana (por ejemplo, a diferentes puntos (Punto 1 y Punto 2) dentro del epítipo Lym-1 del HLA-DR10).

50 Una vez que se han identificado los conjuntos de ligandos que se unen a diferentes puntos de la diana, se puede evaluar también opcionalmente la orientación de los ligandos en los puntos de unión utilizando simulaciones clásicas de dinámica molecular. Los métodos para realizar simulaciones de dinámica molecular se describen claramente en los Ejemplos. Para ejemplo, para cada ligando se pueden simular entre una y tres orientaciones en la hendidura de unión durante 500 pseg. Esto ayudará a determinar qué grupos funcionales de los ligandos probablemente estarán en contacto con la diana y qué grupos funcionales resultan accesibles mediante solvente. Esta información se puede utilizar para identificar análogos con grupos funcionales modificados o diferentes que se pueden someter a ensayo para determinar su capacidad para unirse a la diana y confirmar que un grupo funcional concreto se puede utilizar como punto para la unión del enlazador sin alterar la unión del ligando a la diana.

60 El uso de estos métodos para identificar ligandos que se unen a puntos específicos de diversas dianas

está documentado en la bibliografía. Por ejemplo, estos métodos se han utilizado para identificar ligandos que se unen a puntos específicos del dominio diana de la neurotoxina del tétanos (Cosman *et al.* (2002) *Chem Res Toxicol* 15:1218-1228; Lightstone *et al.* (2000) *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 356-362), así como 11 ligandos que ya hemos identificado que se unen a HLA- DR10.

5 Otros estudios anteriores que han utilizado un planteamiento similar para identificar ligandos que se unen a dos puntos del dominio diana de la neurotoxina del tétanos (*Id.*) han requerido la selección de menos de 30 ligandos experimentalmente. Se observó experimentalmente la unión de más de la mitad de los ligandos que se preveía que se unían a la proteína. Por tanto, creemos que la selección de un conjunto de 30 ligandos por punto debería proporcionar un número suficiente de compuestos que se unen para iniciar la síntesis del SHAL. Sin embargo, si en algunas realizaciones, no se ha identificado un número adecuado de ligandos (por ejemplo, entre tres y cinco) que se unen en una primera ronda de selecciones por NMR, se pueden seleccionar y analizar series adicionales de ligandos hasta encontrar los ligandos adecuados que se unen a dos puntos diferentes de la diana.

15 En determinadas divulgaciones, la selección de los pares de ligandos (u otras combinaciones de múltiples ligandos) a unir se basa en los criterios siguientes (en orden de importancia descendente): 1) punto de unión (los dos ligandos que componen un par preferiblemente se unen a puntos diferentes); 2) fiabilidad de la información obtenida sobre grupos funcionales disponibles que se puede utilizar para unir las moléculas al enlazador sin alterar la unión (se concede prioridad a los análogos con derivados conocidos cuya unión se ha confirmado, lo que indica que la modificación de un grupo funcional concreto no afecta a la unión); 3) la facilidad prevista de unión del ligando al enlace (los ligandos tienen preferiblemente grupos funcionales que facilitan la química de unión asimétrica para poner un ligando diferente en extremos opuestos del enlace); 4) la afinidad de unión relativa, por ejemplo determinada mediante experimentos de difusión por NMR (normalmente se seleccionan primero los ligandos que presentan la unión más sólida a la proteína); 5) información conocida acerca de su toxicidad en animales o seres humanos (normalmente se da prioridad al uso de ligandos que se sabe que no son tóxicos o cuyo uso en otros productos farmacéuticos ya ha sido aprobado); y 6) coste del ligando.

Dado que es probable que algunos de los ligandos individuales (fracciones de unión) puedan presentar una unión débil con otras proteínas, no será necesario (ni significativo) preseleccionar los ligandos individuales para determinar si se unen a otras proteínas que se podrían encontrar en la circulación antes de utilizarlos en la producción de SHAL. Se prevé que la unión de cualquier ligando individual (la mitad del par utilizado para crear un SHAL bidentado) a otras proteínas será débil (micromolar a lo sumo). Por consiguiente, la disociación de la molécula será alta y el SHAL que únicamente se une a través de un ligando a otras proteínas se eliminará rápidamente del tejido y la circulación. Típicamente solo se obtendrán afinidades elevadas (y bajas disociaciones) cuando los dos ligandos del par se unan simultáneamente a puntos separados por la distancia adecuada, que viene dictada por la longitud del enlace que los conecta. Estos dos criterios solamente se cumplirán cuando el SHAL entre en contacto con la diana prevista. Una vez unido, se prevé que la disociación se reducirá entre 1000 y 1 000 000 de veces (basándonos en estudios previos) respecto a la observada para cualquier ligando individual. Por esta razón, no se espera que la reactividad cruzada suponga una complicación significativa.

40 **E) Métodos computacionales/empíricos combinados**

La unión de un SHAL a la región o regiones de su diana se basa en el ajuste y la carga, y es dependiente de la estructura 3D y de los componentes de las fracciones de unión. En el método computacional anteriormente descrito, la generación de SHAL puede implicar la definición/identificación de una región o regiones atractivas sobre la molécula diana. Así, por ejemplo, se pueden elaborar modelos de proteínas de todo tipo, incluyendo antígenos, receptores y proteínas de señalización, para encontrar puntos de acoplamiento molecular y ligandos. Posteriormente los ligandos se pueden someter a ensayo utilizando métodos empíricos. Estos métodos requieren típicamente el conocimiento de las moléculas integrantes que se incluirán en los modelos.

50 Los métodos empíricos anteriormente descritos se basan en la selección de bibliotecas (por ejemplo, bibliotecas combinatorias) de potenciales ligandos para encontrar los agentes ligantes adecuados. En este método no se requiere ningún conocimiento previo además de la disponibilidad de una diana (por ejemplo, proteína, célula, etc.) de interés.

Las bibliotecas se desechan de forma selectiva para hallar los agentes ligantes. Esto se puede realizar mediante competencia con una

55 molécula, como un anticuerpo, péptido o químico (ligando), que se sabe que reacciona con la molécula en la región elegida a focalizar. Este método permite la eliminación de péptidos o químicos de unión que no son de interés, así como la definición de los que se unen a la región de interés.

60 Un tercer método tiene una naturaleza intermedia y utiliza los conocimientos previos de moléculas diana atractivas y de las regiones de estas moléculas para la selección competitiva inicial y la contraselección. Así por ejemplo, se pueden expresar computacionalmente las dianas iniciales o los componentes de las bibliotecas de ligandos. A continuación la diana o colección de dianas optimizada y la biblioteca optimizada se pueden someter a selección y contraselección como se ha descrito en el presente para

identificar los agentes ligantes óptimos.

F)Selección de bibliotecas basadas en perlas

Un método para la selección de ligandos que se unen a las moléculas diana implica la producción de una biblioteca combinatorial que comprende un gran número de potenciales ligandos, cada uno de ellos unido a un soporte sólido/perla diferente. La biblioteca combinatorial puede ser una biblioteca "aleatoria" o puede ser sintetizada para proporcionar números de variantes que tienen, por ejemplo, una química esencial concreta (por ejemplo, optimizada).

Los métodos sintéticos combinatoriales son bien conocidos y se utilizan para producir rápidamente grandes "bibliotecas" de compuestos distintos. En diversas realizaciones, el material de partida (por ejemplo, un aminoácido) se une covalentemente a un soporte sólido. A esto le sigue la adición gradual de monómeros (típicamente monómeros protegidos), tales como aminoácidos, nucleótidos, moléculas orgánicas pequeñas y similares. Se pueden crear millones de moléculas distintas variando el número de pasos y el número de reactivos (por ejemplo, en un enfoque de síntesis de combinar y dividir), pero típicamente cada perla solo contiene un compuesto.

Los compuestos comprendidos en la biblioteca se pueden seleccionar mientras todavía se encuentran unidos a las perlas. Se pueden utilizar métodos colorimétricos, fluorométricos, radiográficos o de otro tipo para visualizar las perlas positivas (de unión). Estas pueden ser capturadas (por ejemplo, con una pipeta, una varilla metálica si las perlas son magnéticas) y, a continuación, se puede caracterizar el compuesto.

Así, por ejemplo, se puede sintetizar una biblioteca de ligandos peptídicos que se unen a las moléculas de HLA-DR10. La química de síntesis de péptidos está bien desarrollada. Sin embargo, para obtener ligandos peptídicos que tienen una vida útil más prolongada *in vivo*, se podría optar por producir una biblioteca de ligandos peptídicos donde los péptidos comprenden D-aminoácidos. Se espera que estos péptidos sean más resistentes a la proteólisis *in vivo*. Por otra parte, por lo general los D-aminoácidos se consideran no tóxicos.

El epítipo Lym-1 del HLA-DR10 es altamente polar. Por tanto, al sintetizar la biblioteca de potenciales agentes ligantes, se pueden seleccionar D-aminoácidos polares para la síntesis (por ejemplo, Ser, Asp, etc.). Utilizando la síntesis de combinar y dividir (véase, por ejemplo, la Patente USA 5 574 656), se crea una biblioteca de D-péptidos unidos a las perlas.

A continuación se añade HLA-DR10 marcado HRP a la mezcla de perlas. La etiqueta de color HRP es visualizada y se extraen las perlas positivas. A continuación las perlas positivas se pueden someter a ensayo contra, por ejemplo, las líneas de células HLA-DR10 positivas. A continuación, las perlas que dan un resultado positivo en este ensayo se pueden someter a ensayo contra, por ejemplo, un panel de tejido para garantizar que la unión es específica para HLA-DR10. Los agentes ligantes específicos de este ensayo se pueden caracterizar a continuación (por ejemplo, secuenciarse utilizando la degradación de Edman, espectrometría de masas, etc.).

Alternativamente, hay estrategias para codificar la identidad de cada compuesto durante la síntesis de la biblioteca (véanse, por ejemplo, las Patentes USA 5 565 324; 5 723 598;

5 834 195; 6 060 596; 6 503 759; 6 507 945; 6 721 665; 6 714 875; y similares). Utilizando

estas estrategias de "marcación", la identidad de los agentes ligantes positivos se puede determinar fácilmente.

G)Unión de los ligandos (fracciones de unión) para producir un SHAL polidentado

Una vez que se identifican dos ligandos más (fracciones de unión) que se unen a diferentes puntos de la diana, los ligandos se enlazan directamente o a través de un enlazador para producir un SHAL polidentado. Cuando se unen solamente dos ligandos el SHAL es bidentado. Cuando se unen tres ligandos el SHAL es tridentado y así sucesivamente.

Los expertos en la técnica conocen diversos métodos químicos para unir moléculas directamente o a través de un enlazador. La química específica empleada para unir los ligandos (fracciones de unión) entre sí para formar un SHAL dependerá de la naturaleza química del ligando o los ligandos y del espacio deseado entre ligandos. Típicamente los ligandos contienen diversos grupos funcionales, por ejemplo ácido carboxílico (COOH), grupos amino libres (-NH₂), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado de un enlazador o del otro ligando para unirse al ligando.

Alternativamente, el ligando o ligandos se pueden derivatizar para exponer o unir otros grupos funcionales reactivos. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas enlazadoras, como las comercializadas por Pierce Chemical Company, Rockford (Illinois).

Un "enlazador", a efectos del presente, es una molécula que se utiliza para unir dos o más ligandos (fracciones de unión) para formar un SHAL polidentado. El enlazador se selecciona típicamente para ser capaz de formar enlaces covalentes con todos los ligandos incluidos en el SHAL. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, entre otros, enlazadores de

carbono de cadena recta o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos, aminoácidos, ácidos nucleicos, dendrímeros, polímeros sintéticos, enlazadores peptídicos, análogos de péptidos y ácidos nucleicos, carbohidratos, polietilenglicol y similares. Cuando uno o más de los ligandos incluidos en el SHAL son polipéptidos, los enlazadores se pueden unir a los aminoácidos integrados a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a la cisteína) o a través de los grupos amino o carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

En determinadas realizaciones, se puede utilizar un enlazador bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo del primer ligando y otro grupo reactivo con un grupo funcional del segundo ligando para formar el SHAL deseado. Alternativamente, la derivatización puede implicar el tratamiento químico del ligando o ligandos, por ejemplo el clivaje del glicol de la fracción de azúcar de la glicoproteína, el carbohidrato o ácido nucleico con periodato para generar grupos aldehído libres. Los grupos aldehído libres se pueden hacer reaccionar con los grupos amino o hidrazina libres de un enlazador para unir el enlazador al ligando (véase, por ejemplo, la Patente USA n.º 4 671 958). Los procedimientos para la generación de grupos sulfhidrilo libres en el polipéptido, como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, también son conocidos (véase la Patente USA n.º 4 659 839).

En determinadas realizaciones, se utilizan enlazadores basados en lisina, ácido glutámico y polietilenglicol (PEG) de diferente longitud para acoplar los ligandos. Diversos SHAL se han sintetizado utilizando una combinación de lisina y PEG para crear los enlazadores (véanse, por ejemplo, los Ejemplos y la Figura 13). La química de la conjugación de moléculas con PEG es bien conocida por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Veronese (2001) *Biomaterials*, 22:405-417; Zalipsky y Menon-Rudolph (1997) Pp. 318-341 In: *Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications*. J.M. Harris y X. Zalipsky (eds), Am. Chem. Soc. Washington, D.C.; Delgado *et al.* (1992) *Drug Carrier Syst.*, 9:249-304; Pedley *et al.* (1994) *Br. J. Cancer*, 70:1126-113-0; Eyre y Farver (1991) Pp.377-390 In: *Textbook of Clinical Oncology*, Holleb *et al.* (eds), Am.Cancer Soc., Atlanta GA; Lee *et al.* (1999) *Bioconjug. Chem.*, 10:973-981; Nucci *et al.* (1991) *Adv. Drug Deliv.*,6:133-151; Francis *et al.* (1996) *J. Drug Targeting*, 3: 321-340).

Una característica favorable del esquema sintético utilizado para crear estos SHAL es que el enfoque permite la unión de prácticamente cualquier tipo de molécula a un tercer punto del enlazador. En la primera ronda de síntesis de SHAL, la biotina se ha unido a este punto para facilitar los estudios de unión *in vitro*. El marcador de biotina hace posible medir rápidamente la unión a la proteína aislada por resonancia de plasmones superficiales y examinar la selectividad del SHAL para unirse a secciones de tejido y células vivas.

Una vez que el SHAL se ha sometido a ensayo y que se ha confirmado que se une a la diana (por ejemplo, HLA-DR10), se pueden añadir quelantes de metales como DOTA (u otros efectores) en la ronda final de síntesis para permitir la administración de radionúclidos u otros efectores en las células portadoras diana (por ejemplo, células tumorales).

Después de volver a someter a ensayo los conjugados efector-SHAL para reconfirmar su capacidad para unirse a la diana, los conjugados que presentan la mejor selectividad para sus dianas pueden, opcionalmente, someterse a ensayo para determinar su biodistribución en organismos de ensayo (por ejemplo, ratones). También se pueden añadir otras moléculas únicas a este punto en estudios futuros, por lo que estos mismos SHAL se pueden utilizar también, por ejemplo, para probar la utilidad de enfoques pre-focalización para la administración de radioisótopos.

H) Síntesis gradual de SHAL en fase sólida

En determinadas realizaciones, la síntesis de SHAL se produce a través de un planteamiento de síntesis gradual en fase sólida. En este enfoque cada componente del enlazador o ligando se une a una molécula creciente (SHAL) unida covalentemente a la superficie de una resina. Después de cada reacción química la resina se puede lavar abundantemente para eliminar los productos que no han reaccionado.

En un enfoque, el DOTA se unió al enlazador al comienzo de la síntesis. Una vez lavado el exceso de DOTA, se realizaron múltiples reacciones químicas adicionales sobre la resina para añadir los diversos enlazadores y ligandos, y tras cada reacción se lavaron de nuevo los productos que no habían reaccionado. Para el momento en el que la síntesis del SHAL se había completado, la cantidad de DOTA libre presente en la muestra era indetectable por HPLC y espectroscopia de masas. El enlace de DOTA es extremadamente estable, por lo que una vez que se ha unido no se desprende del SHAL.

I) Selección de SHAL en función de la afinidad y selectividad

En determinadas divulgaciones, una biblioteca de SHAL que comprende diferentes ligandos (fracciones de unión) y/o que comprende enlazadores de diferente longitud se selecciona para identificar los SHAL que presentan la mejor afinidad y/o selectividad para la diana. Estos ensayos de selección se pueden realizar en diversos formatos incluyendo, entre otros, la selección por unión a dianas aisladas, para selección por unión a células en cultivo, la selección por unión a células en arrays de tejidos y la selección por unión *in vivo* a la diana deseada.

1. Unión de SHAL a dianas aisladas (por ejemplo, proteínas)

En determinadas realizaciones, las afinidades de unión de los mejores SHAL se puede estimar por espectrometría de masas de los complejos SHAL-diana, seguida de una medición por espectroscopia de resonancia de plasmones superficiales (SPR) más precisa (Shuck (1997) *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*,26:541-566; Van Regenmortel (2001) *Cell Mol Life Sci.*,58:794-800) de la afinidad de unión SHAL-diana utilizando, por ejemplo, los instrumentos IASYS Plus o BiaCore. A fin de realizar la medición SPR, se puede añadir biotina al enlazador a través de un tercer grupo funcional (como el anteriormente descrito) y el SHAL se puede unir a partículas revestidas de estreptavidina disponibles en el mercado. En determinadas divulgaciones preferibles, solo se pueden considerar útiles los SHAL que presentan afinidades de unión nM o superiores. Los SHAL que presentan la mayor afinidad se pueden someter a ensayo a continuación para determinar su selectividad. Se pueden realizar experimentos para someter a ensayo la selectividad de los SHAL que se unen a las dianas en presencia de moléculas relacionadas con las dianas. Así, por ejemplo, cuando el SHAL se dirige al HLA-DR10, se puede evaluar la capacidad del SHAL para unirse a moléculas diana en presencia de proteínas de superficie de células Raji extraídas y separadas por cromatografía de afinidad. Después de tratar el gel con el SHAL biotinilado y enjuagar el exceso de SHAL no unido, se puede detectar la ubicación del SHAL unido mediante tinción con estreptavidina etiquetada con rodamina. En determinadas realizaciones, los SHAL que se considera que presentan una selectividad razonable por la proteína pueden ser aquellas moléculas en las que el 95% o más de la fluorescencia está asociada con los picos de multímero y monómero de HLA-DR10.

2.Unión de SHAL a células en cultivo

Cuando la diana del SHAL es un marcador en una célula (por ejemplo, un marcador de una célula cancerígena), puede resultar recomendable valorar la especificidad de unión del SHAL a las células intactas.

Los estudios de unión de las células se pueden realizar con los SHAL biotinilados (o etiquetados de otro modo), utilizando por ejemplo la fluorescencia de la estreptavidina etiquetada con rodamina unida para confirmar los SHAL que se unen a células diana (por ejemplo, Raji). Si se observa que el SHAL se une, las mediciones SPR se pueden realizar para determinar la afinidad de las células intactas al SHAL. En determinadas realizaciones, los SHAL que presentan al menos una diferencia de dos veces, preferiblemente al menos de cinco veces y más preferiblemente al menos de diez veces en la intensidad de tinción de las células diana (por ejemplo, tumor) sobre los controles se pueden seleccionar para su posterior ensayo y desarrollo. Los análogos de los SHAL más prometedores se pueden sintetizar con una molécula DOTA unida al enlazador, y se pueden realizar experimentos de unión utilizando SHAL etiquetados con radionúclidos para obtener más datos cuantitativos y también para intentar determinar si el SHAL se mantiene en la superficie de la célula o se internaliza utilizando NanoSIMS u otros métodos.

Esta información resulta útil para decidir acerca del tipo de radioisótopo que se va a cargar en el quelante. Si el SHAL permanece en la superficie, el SHAL se utiliza típicamente solo o con efectores que no requieren internalización (por ejemplo, emisores alfa como ⁹⁰itrio, diversas etiquetas detectables y similares). Si se obtienen pruebas que sugieren que el SHAL es internalizado tras la unión a las células diana, se puede utilizar el SHAL con efectores que son activos cuando se internalizan.

3.Análisis de selectividad celular utilizando arrays de tejidos

La tecnología array de tejidos se puede utilizar para seleccionar SHAL al objeto de determinar la especificidad del tejido (por ejemplo, reactividad del tejido maligno y normal en caso de SHAL anti-tumor). Los arrays de tejidos son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Kononen *et al.* (1998) *Nat Med.*,4:844- 847; Torhorst *et al.* (2001) *Am J Pathol.*,159:2249-2256; Nocito *et al.* (2001) *Int J Cancer*, 94:1-5, y similares). En su forma básica, los microarrays de tejidos se forman tomando pequeños núcleos de cada caso/bloque de tumor individual y montando los núcleos en un único bloque (*Id.*). Al seccionar este nuevo bloque, se pueden utilizar técnicas de inmunohistoquímica estándar e hibridación *in situ*. Por tanto, se pueden someter a ensayo cientos de muestras de tejido en un experimento en lugar de tener que realizar cientos de experimentos diferentes. Las Figuras 2 y 3 resaltan cómo se pueden utilizar los arrays de tejidos y muestran un diagrama de un array de tejido ilustrativo.

En una divulgación, para el array de tejidos normal hemos identificado 80 tejidos únicos, que incluyen orofaríngea, corazón, pulmón, estómago, bazo, hígado, riñón, intestino, médula espinal, páncreas, vejiga, músculo, tejido adrenal, mama, cerebro, tejido prostático normal y piel para la colocación en el microarray de tejidos. Para un array de tejidos específico de linfocitos, hemos incluido líneas de linfocitos neoplásicos, xenoinjertos y material de un paciente recogido del Human Biological Specimen Repository de UC Davis. Usando estos arrays de tejidos u otros similares, se puede determinar la unión no específica de los SHAL a tejido normal y la unión específica a neoplasias linfocíticas y prostáticas. La hibridación de los SHAL a los arrays de tejidos es directa. Utilizando SHAL biotinilados como los descritos en el presente, se puede utilizar fácilmente estreptavidina etiquetada (por ejemplo, estreptavidina etiquetada con rodamina) para identificar las células que se unen a los SHAL. Cuando es necesario, los resultados de los microarrays de tejidos se pueden verificar mediante inmunohistología o histología convencional.

En un enfoque ilustrativo, se pueden perforar 2-4 cilindros de tejido, con un diámetro de 0,6 mm desde las áreas seleccionadas de cada bloque de tejido del "donante" e introducirse en un bloque de parafina receptor a fin de producir el microarray de tejido, utilizando un Tissue Microarrayer (por ejemplo, Beecher

- Instruments, Silver Spring, Maryland) y las técnicas descritas por Kononen et al. (1998) *Nat Med.*, 4:844-847. A continuación se pueden seccionar los portaobjetos con microarrays de tejido que contienen, por ejemplo, 200-400 núcleos, con un grosor de 4 µm. La tinción rutinaria con hematoxilina y eosina se puede realizar para verificar que cada núcleo representa su histopatología seleccionada. Para la inmunohistoquímica, se pueden utilizar microondas en un tampón de citrato para la recuperación del antígeno. Las imágenes de los portaobjetos se pueden capturar mediante escáner confocal (ScanScope, Mountain View, CA) y visualizarse con MrSid Viewer 2.0 (LizardTech, Inc.) como se describe a continuación. La capacidad para visualizar las imágenes del array de tejido en un ordenador en lugar de un microscopio aumenta drásticamente la eficiencia del análisis.
- El principal obstáculo para la patología digital ha sido la representación de portaobjetos de vidrio en un formato digital. A diferencia de la radiología, que comienza por una representación digital de un paciente por CR, MRI o ahora "película plana digital", la patología requiere que todas las muestras de tejido sean procesadas y convertidas en secciones de tejido teñidas montadas en portaobjetos de vidrio para la interpretación. La nueva tecnología produce imágenes de todo el portaobjetos de vidrio, produciendo así una verdadera representación digital de la muestra histopatológica completa (Whole Slide Imaging). La mayoría de los instrumentos actuales utilizan un microscopio equipado con una cámara digital y una platina robótica para capturar miles de imágenes individuales. Cada imagen es enfocada por el experto en contenidos. Una vez capturadas, estas imágenes son típicamente cosidas (o dispuestas en forma de baldosas) para formar la representación final del portaobjetos. El proceso lleva mucho tiempo y, debido al elevado número de imágenes que implica, a menudo no están bien alineadas.

ScanScope, (Aperio® Technology) es un nuevo tipo de escáner digital que

escanea un portaobjetos de microscopio en 3-5 minutos, capturando imágenes de 8-10 gigabytes a 50.000 dpi. A continuación las imágenes se comprimen, procesan y almacenan para su presentación (véase a continuación).

- MrSid® de Lizardtech® comprime las grandes imágenes de 8-10 gigabytes utilizando un formato Jpeg de ondulada multicapa propio con ratios de compresión que alcanzan un ratio de 10:1 sin una degradación significativa de la imagen. Las imágenes se pueden ver localmente o se pueden alojar en un servidor web. A diferencia de las imágenes fijas estándar de la web, que normalmente se descargan para verlas con un navegador, las imágenes procesadas de MrSid se visualizan desde la web y la aplicación del navegador nunca descarga la imagen completa. Dado que las imágenes se obtienen a su resolución máxima, el servidor construye vistas de una imagen con un aumento "inferior". Utilizando la combinación de ScanScope y el navegador Zoomify, se pueden capturar imágenes completas (12 gigabytes) y procesarse en menos de 20 minutos.

4. Análisis de selectividad *in vivo*

- Por supuesto, la selectividad *in vivo* de un SHAL también se puede determinar con facilidad. Esto se puede conseguir administrando el SHAL a un animal de ensayo (por ejemplo, una rata de laboratorio) que comprende una célula o tejido que contiene la diana a la que está dirigida el SHAL. Cuando ha transcurrido un tiempo suficiente, el animal puede ser sacrificado y el tejido o los tejidos diana y los tejidos normales se pueden examinar (por ejemplo, histológicamente) para evaluar la especificidad y la cantidad de administración de SHAL. En determinadas realizaciones, el SHAL puede estar unido a un reactivo de captura de imágenes que permite la captura no invasiva de imágenes y, por tanto, permite la evaluación de la farmacodinámica en tiempo real.

- A título ilustrativo, se pueden realizar estudios farmacocinéticos y dosimétricos de radiación con ratones, por ejemplo, en los SHAL ilustrados en los Ejemplos, para generar datos con los que seleccionar uno para los ensayos clínicos de farmacocinética y dosimetría de radiación en pacientes, utilizando los métodos establecidos. El estudio farmacocinético se puede realizar en una hembra de ratón nude que porta xenoinjertos de linfoma humano Raji de un tamaño definido utilizando los métodos establecidos (DeNardo et al. (1998) *Clin. Cancer Res.*, 4:2483-2490; Kukis et al. (1995) *Cancer Res.*, 55:878-884). A los ratones se les pueden inyectar SHAL etiquetados con DOTA conteniendo ¹¹¹In o ⁹⁰Y y los ratones pueden ser sacrificados, por ejemplo, en cada uno de al menos cinco puntos temporales a fin de obtener muestras para el análisis. Los estudios iniciales se pueden realizar en los extremos de los puntos temporales temprano y tardío previstos para estas pequeñas moléculas, al objeto de poder determinar los puntos temporales intermedios. Se pueden utilizar los datos para los péptidos a fin de definir los puntos temporales extremos. Cuando se utiliza ¹¹¹In o ⁹⁰Y como trazador, el punto temporal más largo sería típicamente de unos cinco días. La eliminación completa del organismo se puede determinar utilizando un sistema detector de yoduro de sodio. La eliminación de la sangre se puede controlar tomando muestras de sangre periódicas de las venas de la cola del ratón. En el momento del sacrificio se puede extraer el xenoinjerto y tejidos normales, pesarse y contarse en un contador gamma de pocillos para obtener los datos de distribución en los órganos.

- A fin de valorar el efecto (total) de la dosis de SHAL, se pueden realizar estudios, por ejemplo, a niveles de cinco dosis, una vez más comenzando con pequeñas y grandes cantidades de SHAL para guiar la selección de las cantidades intermedias a estudiar. Dado que los SHAL son algo novedoso, la selección

de puntos temporales del estudio y los niveles de dosis típicamente se guiarán por la información disponible para los estudios con anticuerpos (por ejemplo, Lym-1) en ratones y para, por ejemplo, los ligandos peptídicos del receptor de somatostatina.

5 En determinadas realizaciones, la dosimetría y farmacocinética ideales a conseguir con nuestros SHAL son aquellas que se aproximan a lo que se ha conseguido utilizando yoduro de sodio (NAL) en el tratamiento de tumores de tiroides. Los SHAL serán los suficientemente pequeños como para penetrar completamente en la célula maligna y se excretarán fácilmente por la orina. Típicamente, una afinidad de unión y reconocimiento de la diana de al menos un orden de magnitud mejor para los linfomas y las leucemias que el de los anticuerpos actuales proporcionará la selectividad deseada de las células tumorales. A pesar de que la rápida eliminación de la circulación de las moléculas de menor tamaño, como los SHAL, podría considerarse una desventaja, la notable efectividad del Nal en el tratamiento de tumores de tiroides ha demostrado que esta "desventaja" se puede convertir en una ventaja si el reactivo tiene la combinación adecuada de afinidad y selectividad. Si se seleccionan bien los SHAL, tienen como diana únicamente una familia específica de células (por ejemplo, linfocitos B y sus afines malignos), se unen con fuerza con bajas tasas de desprendimiento, y se eliminan rápidamente del sistema, la dosis recibida por el tejido normal (respecto del maligno) sería sustancialmente menor que la obtenida utilizando los anticuerpos existentes dirigidos a una diana.

10 Utilizando los métodos establecidos (DeNardo *et al.* (2000) *J. Nucl. Med.*, 41:952-958; DeNardo *et al.* (1999) *J. Nucl. Med.*, 40:1317-1326; DeNardo *et al.* (1999) *J. Nucl. Med.*, 40:302-310; Shen *et al.* (1994) *J. Nucl. Med.*, 35:1381-1389; Siegel (1994) *J. Nucl. Med.*, 35:1213-1216) como directrices, se pueden desarrollar fácilmente protocolos para realizar estudios farmacocinéticos y de dosimetría de radiación en pacientes con enfermedades linfomatosas de células B u otros cánceres. Los niveles (totales) de la dosis de SHAL previstos se pueden determinar utilizando los datos generados en ratones y ajustarse para la BSA relativa de los ratones y pacientes utilizando los métodos conocidos (*véase, por ejemplo*, Freireich *et al.* (1996) *Cancer Chemother. Rep.*, 50: 219-244). En determinadas realizaciones, se selecciona un protocolo que proporciona el nivel de dosis óptimo utilizando información sobre los índices terapéuticos para tumor en médula para una estrategia no mieloablativa y tumor en órgano no medular limitador de dosis para una estrategia mieloablativa.

J) Optimización de la afinidad, selectividad y metabolismo del SHAL variando la

30 longitud de enlazador y la estructura del enlazador y del ligando

La afinidad, selectividad y metabolismo del SHAL pueden optimizarse variando la longitud del SHAL y/o la estructura del enlazador y del ligando, utilizando modelos informáticos y estudios experimentales. Las longitudes de los enlazadores pueden reducirse o aumentarse para mejorar la afinidad del SHAL con su diana. También se pueden realizar cambios en los ligandos individuales utilizados para crear el SHAL o introducir alteraciones en la estructura de los ligandos individuales para mejorar la unión, la selectividad de la diana y optimizar la eliminación de los SHAL no unidos del organismo. Las modificaciones en la estructura del propio enlazador también pueden plantearse para facilitar la eliminación del SHAL, si procede, de los tejidos normales y de la sangre periférica a través de la incorporación de enlaces clivables (por ejemplo, un péptido u otro enlazador clivable) para unir el quelante al SHAL.

40 Si se observa que un SHAL concreto presenta una unión no específica (por ejemplo, a muchas proteínas en los extractos celulares o tanto a células Raji como de control), se pueden sintetizar SHAL adicionales utilizando diferentes pares de ligandos hasta que se identifique un SHAL con la especificidad adecuada.

1. Maximización de la afinidad de unión del SHAL para la molécula(s) diana

45 La afinidad de unión de los reactivos multidentados con las dianas de la proteína o la superficie celular puede aumentarse uno o varios órdenes de magnitud cambiando y optimizando la longitud del enlazador que separa a los ligandos. Sin limitarse a una teoría concreta, se cree que este aumento está relacionado con la consecución de la separación óptima entre los ligandos para permitir que estos se unan a sus puntos individuales, así como con el hecho de facilitar una flexibilidad rotacional suficiente dentro del propio enlazador para permitir la interacción óptima de cada ligando dentro de su punto de unión (por ejemplo, hendidura de unión).

50 En determinadas realizaciones, la longitud inicial del enlazador elegido para su uso en los SHAL iniciales se identifica calculando la distancia entre los dos (o más) ligandos unidos que se van a enlazar entre sí. Una vez que se determina que una combinación concreta de ligandos enlazados realmente se une a la diana, se pueden realizar modelos adicionales para perfeccionar más la longitud del enlazador y optimizar la afinidad de unión de los SHAL.

55 Por ejemplo, cuando la diana es HLA-DR10, se pueden realizar modelos de la estructura de la subunidad beta de HLA-DR10 con los dos ligandos unidos en sus respectivas hendiduras y enlazadores PEG de diversas longitudes interconectando los ligandos (*véanse, por ejemplo*, los Ejemplos del presente documento). Con estudios de dinámica molecular se pueden evaluar las orientaciones de los ligandos unidos para mejorar el diseño del enlazador. Se pueden realizar otras simulaciones de dinámica molecular para incluir los enlazadores y los ligandos, simulando así los ligandos polidentados que interactúan con la

diana, por ejemplo, como los descritos aquí.

Una vez que se obtienen los resultados de estos experimentos con modelos, puede sintetizarse un conjunto adicional de SHAL con enlazadores con un rango de los tamaños calculado como óptimo, y sus afinidades de unión pueden someterse a ensayos experimentales.

5 **2.Optimización de la selectividad de la diana y del metabolismo del SHAL**

También pueden utilizarse métodos computacionales para determinar si los cambios en la estructura de los ligandos individuales que se enlazan para producir el SHAL mejoran la selectividad de la diana y optimizan el metabolismo del SHAL y su eliminación de los tejidos normales y la circulación periférica. Esto se puede conseguir, por ejemplo, examinando los tipos de grupos funcionales presentes en el interior de una hendidura de unión establecida como diana y su ubicación respecto al ligando unido.

Pueden realizarse estudios de dinámica molecular utilizando diferentes conformaciones del ligando y análogos de ligandos seleccionados para facilitar la identificación de derivados de los ligandos que se ajustan de forma óptima a cada punto de unión (por ejemplo, hendidura). Pueden realizarse experimentos de difusión NMR (Lin *et al.* (1997) *J. Organic Chem.*, 62:8930-8931) para comparar y clasificar las afinidades de un subconjunto de los análogos de los ligandos. Los análogos concretos elegidos para el análisis se seleccionan típicamente en función de los resultados proporcionados por modelos informáticos y por la disponibilidad en el mercado de estos análogos o por la facilidad de síntesis. Si se identifican experimentalmente análogos con una afinidad superior, puede sintetizarse un conjunto de SHAL nuevos y someterse a ensayo para determinar su afinidad, selectividad de unión a dianas y propiedades metabólicas recomendables (por ejemplo, eliminación rápida de la circulación periférica, el hígado y el riñón).

En determinadas realizaciones, el pequeño tamaño del SHAL puede provocar que se elimine de los tejidos con demasiada rapidez como para ser efectivo en la administración de una cantidad adecuada del efector en las células diana. Si pasa esto, pueden utilizarse diversos enfoques para optimizar el tiempo de retención del SHAL en el tejido diana. Uno implica el uso de un punto de unión de biotina en el enlazador para añadir un tercer ligando que se una a otro punto de la diana. Se espera que esto aumente la afinidad del SHAL a niveles subpicomolares y reducir la tasa de desprendimiento de la molécula unida de forma drástica. Alternativamente, el tamaño efectivo del SHAL puede aumentarse sustancialmente mediante la unión a moléculas PEG multibrazo de mayor tamaño y/o a otras moléculas.

30

K)Ejemplos ilustrativos de SHAL

Utilizando las enseñanzas proporcionadas aquí, puede prepararse fácilmente una serie de SHAL diferentes que se unan, por ejemplo, a marcadores cancerígenos (por ejemplo, el HLA-DR10). En determinadas realizaciones, los SHAL incluyen, entre otros, SHAL bidentados (comprendiendo dos ligandos de unión), SHAL tridentados (comprendiendo tres ligandos de unión), SHAL tetradentados (comprendiendo cuatro ligandos de unión), SHAL pentadentados (comprendiendo cinco ligandos de unión), etc. En diversas divulgaciones pueden ser multímeros (por ejemplo, estructuras y/o complejos que comprenden dos, tres, cuatro, cinco o más SHAL). Los SHAL pueden ser homomultímeros (comprendiendo dos, tres, cuatro, cinco o más SHAL del mismo tipo) o heteromultímeros (comprendiendo, por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco o más SHAL, donde al menos hay dos especies diferentes de SHAL).

En determinadas realizaciones, los SHAL comprenden uno o más, preferiblemente dos o más, o tres o más ligandos descritos en cualquiera de las Tablas 1, 5, 6, 7 u 8 y/o análogos de estos. Determinados SHAL preferentes incluyen, entre otros, SHAL bidentados (véanse, por ejemplo, las Figuras 22 y 23), SHAL tridentados (véase, por ejemplo, la Figura 24A), SHAL bidentados diméricos, SHAL (bis) tridentados biméricos (véase, por ejemplo, la Figura 24B) y similares. En determinadas realizaciones, los SHAL comprenden uno o más de los ligandos mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos ilustrativos de ligandos que se pueden incluir en los SHAL descritos aquí. Algunos de estos (marcados con *) se podrían utilizar en lugar del ligando Ct o unirse al enlazador como un cuarto componente, lo que serviría no para ayudar al SHAL a unirse mejor a la proteína sino como inhibidor una vez que el SHAL entrase en el interior de la célula.

50

1	BOC-4-aminometil-L-Fe
2	*4[[5-(Trifluorometil)piridin-2-il]oxi]fenil]N-fenilcarbamato
3	*Ácido (R)-2-[4-(5-cloro-3-fluoro-2-piridiloxi)fenoxi]propiónico
4	*2-(((3-cloro-5(trifluorometil)piridin-2-iloxi)fenoxi)metil)acrilatos
5	*2-(((3-cloro-5(trifluorometil)piridin-2-iloxi)fenil)metil)acrilatos
6	*2-(((3-cloro-5(trifluorometil)piridin-2-iloxi)fenil)metil)acrilonitrilos
7	*Ácido 3-(3-cloro-4-[[5-(trifluorometil)-2-piridinil]oxi]anilino)-3-oxopropanoico

ES 2 613 844 T3

8	*Setoxidim
9	*Cletodim
10	*Ácido 5-(Tetradeciloxi)-2-furoico
11	*Ácido 2-[(2,6-Diclorofenil)amino]bencenacético
12	*Ácido 2-[4-(4-Clorofenoxi)fenoxi]propanoico
13	*Ácido (RS)-2-[4-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinil]oxi]fenoxi]propanoico
14	*Ácido (RS)-2-[4-(6-cloro-1,3-benzoxazol-2-iloxi)fenoxi]propanoico
15	*Ácido (RS)-2-[4-(2,4-diclorofenoxi)fenoxi]propanoico
16	*Ácido (RS)-2-[4-[5-(trifluorometil)-2-piridiloxi]fenoxi]propanoico
17	*Ácido (RS)-2-[4-(6-cloroquinoxalin-2-iloxi)fenoxi]propanoico
18	*Ácido (RS)-2-[4-(α,α -trifluoro-p-toliloxi)fenoxi]propanoico
19	5-[(4,6-Diclorotriazin-2-il)amino]fluorescein hidrocloreuro
20	Ácido 3-[N-(4-acetilfenil)carbomoil]piridina-2-Carboxílico
21	Ácido 3-(2-[[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinil]oxi]anilino)-3-oxopropanoico
22	L-ornitina-beta-alanina
23	Ácido 2-Metil-1-(3-morfolinopropil)-5-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
24	Ácido hipúrico
25	Hipuril-D-lisina
26	Hipuril-L-fenilalanina

Determinados ejemplos ilustrativos de SHAL también se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Listado de ejemplos ilustrativos de SHAL multidentados, multidentados y quiméricos y su peso molecular (MW en daltons). DOTA en el SHAL aporta otros 400 (o 244 en el caso de la biotina) daltons.

Acrónimo	Identidad	MW
Multidentado		
LeacPLD	acetilado 5-leuencefalina PEG lisina desoxicolato	1.505
ItPLD	triodotironina PEG lisina desoxicolato	1.559
DvLPBaPL	ácido dabsil-L-valina lisina PEG N-benzoil-L-arginil-4-amino-benzoico PEG lisina	1.317
CtLPTPL	Ácido 3-(2-[[3-cloro-5-trifluorometil]-2-piridinil]oxi)-anilino)-3-oxopropanoico lisina PEG L-tironina PEG lisina	1.163
CtLPBaPL	Ácido 3-(2-[[3-cloro-5-trifluorometil]-2-piridinil]oxi)-anilino)-3-oxopropanoico lisina PEG ácido N-benzoil-L-arginil-4-amino-benzoico PEG lisina	1.287
DvPLLCtPCbL	dabsil-L-valina PEG lisina lisina ácido 3-(2-[[3-cloro-5-trifluorometil]-2-piridinil]oxi)-anilino)-3-oxopropanoico PEG ácido 4-[4-(4-clorobencil)piperacino]-3-nitrobencencarboxílico	1.765
Dimérico, multidentado		
(LeacPLD) ₂ LP	(acetilado 5-leuencefalina PEG lisina desoxicolato) ₂ lisina PEG	3.006
(ItPDP) ₂ LL	(triodotironina PEG desoxicolato PEG) ₂ lisina lisina	3.113

(DvLPBaP) ₂ LL	(Ácido dabsil-L-valina lisina PEG N-benzoil-L-arginil-4- aminobenzoico PEG) ₂ lisina lisina	2.626
(DvLPBaPP) ₂ LL	(Ácido dabsil-L-valina lisina PEG N-benzoil-L-arginil-4- aminobenzoico PEG PEG) ₂ lisina lisina	2.921
(DvLPBaPPP) ₂ LL	(Ácido dabsil-L-valina lisina PEG N-benzoil-L-arginil-4- aminobenzoico PEG PEG PEG) ₂ lisina lisina	3.210
(DvLPBaPPPP) ₂ LL	(Ácido dabsil-L-valina lisina PEG N-benzoil-L-arginil-4- aminobenzoico PEG PEG PEG PEG) ₂ lisina lisina	3.501
(DvLCsPBaPPP) ₂ CsLL	(Ácido dabsil-L-valina lisina cisteico PEG ácido N-benzoil-L- arginil-4- aminobenzoico PEG PEG PEG) ₂ ácido cisteico lisina lisina	3.666
(DvPLLcTcCbPPP) ₂ LL	(dabsil-L-valina PEG lisina lisina ácido 3-(2-([3-cloro-5- trifluorometil) -2-piridinil] oxi) - anilino)- 3 - oxopropanionico PEG ácido 4-[4-(4-clorobencil)piperacino]-3-nitrobenzencarboxílico PEG PEG PEG) ₂ lisina lisina	4.267

Se ha descubierto que diversos SHAL descritos aquí son efectivos solo para

inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una célula cancerígena y en determinados casos matar la célula cancerígena. Por tanto, los SHAL pueden utilizarse solos o unidos a uno o más efectores, por ejemplo como los descritos aquí.

5 **L)SHAL unidos a péptidos de transducción**

En determinadas realizaciones los SHAL incluyen (por ejemplo, están unidos a) uno o más péptidos de transducción. Un péptido de transducción es un péptido que actúa como "lanzadera transmembrana", facilitando la entrada del péptido en una célula (por ejemplo, facilitando la penetración en la membrana celular). Los péptidos de transducción son bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos péptidos incluyen, entre otros, la señal de localización nuclear (NLS) del antígeno T del virus del simio 40 (SV40) (Yoneda (1997) *J. Biochem.*, 121: 811-817), el dominio de transducción de proteína de la proteína Tat del VIH (péptido Tat) (Vives *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:16010-16017; Schwarze *et al.* (1999) *Science* 285:1569-1572; Torchilin *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Set, EE.UU.*, 100: 1972-1977.), el péptido de unión a integrina (péptido RGD) (Hart *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:12468-12474), el dominio de unión a heparina de vitronectina (VN peptide) (Vogel *et al.* (1993) *J. Cell Biol.* 121: 461 —468), proteína antenapedia de *Drosophila* (véase, por ejemplo, Joliot *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 88: 1864-1868), penetratina (Tseng *et al.* (2002) *Mol Pharmacol.*,62:864-887), proteínas intactas que pasan naturalmente a través de membranas celulares (la proteína del herpes virus VP22 (Phelan *et al.* (1998) *Nat Biotechnol.*,16: 440-443), transportadores de péptidos catiónicos sintéticos como oligoarginina (Tung y Weissleder (2003) *Adv. Drug Delivery Rev.*, 55: 281-294; Futaki (2005) *Adv. Drug 20 Delivery Rev.*, 57: 547-558), poli-L-lisina lactosilada (Midoux *et al.* (1993) *Nucl Acids Res.*, 21: 871-878), secuencias peptídicas cortas seleccionadas de bibliotecas que presentan fagos (Kamada *et al. Biol Pharm Bull.* 30: 218-223; véanse también los péptidos 1-6 de la Tabla 3) que presentan similitudes de secuencia con lanzaderas de péptidos conocidos y similares.

25 Tabla 3: Ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos de péptidos de transducción.

Péptido	Secuencia	Sec. ID. N.º
1	S-G-E-H-T-N-G-P-S-K-T-S-V-R-W-V-W-D	9
2	S-M-T-T-M-E-F-G-H-S-M-I-T-P-Y-K-I-D	10
3	Q-D-G-G-T-W-H-L-V-A-Y-C-A-K-S-H-R-Y	11
4	M-S-D-P-N-M-N-P-G-T-L-G-S-S-H-I-L-W	12
5	S-P-G-N-Q-S-T-G-V-I-G-T-P-S-F-S-N-H	13
6	S-S-G-A-N-Y-F-F-N-A-I-Y-D-F-L-S-N-F	14
8	G-T-S-R-A-N-S-Y-D-N-L-L-S-E-T-L-T-Q	15
TatI3	G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R-P-P-Q	16

Antennapedia	R-Q-I-K-I-WF-Q-N-R-R-M-K-WK-K	1
VP22	N-A-K-T-R-R-H-E-R-R-R-K-L-A-I-E-R	2
hexa-Arg	R-R-R-R-R-R	3

La anterior lista de péptidos de transducción tiene únicamente carácter ilustrativo y no limitador. Un experto en la técnica conocerá y obtendrá con facilidad otros péptidos de transducción y utilizando las enseñanzas proporcionadas aquí podrá incorporarlos/unirlos a un SHAL. Puede encontrarse una revisión de ejemplos ilustrativos de péptidos de transducción en Derossi *et al.* (1998) *Trends Cell Biol.* 8: 84-87.

(b) Fracciones quiméricas que comprenden SHAL (por ejemplo, SHAL específicos del cáncer)

Los SHAL de esta invención definidos en las reivindicaciones se seleccionan para unirse de forma específica a dianas concretas. Cuando las dianas son marcadores característicos de un tipo de célula concreto (por ejemplo, una célula tumoral), los SHAL pueden utilizarse para administrar de forma específica uno o más efectores en la célula diana.

En la invención, los SHAL se unen específicamente a las células cancerígenas. En estas realizaciones, los SHAL se pueden utilizar solo como terapéuticos (por ejemplo, para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una célula cancerígena) y/o se pueden acoplar a un efector para conseguir una administración eficiente y específica del efector (por ejemplo, una molécula efectora como una citotoxina, una radioetiqueta, etc.) en diversas células cancerígenas (por ejemplo, células aisladas, células metastásicas, células tumorales sólidas, etc.).

En determinadas realizaciones preferibles, los SHAL de esta invención se utilizan en una estrategia de "preselección de la diana" (resultante en la formación de una fracción quimérica en el punto diana tras la administración de la fracción efectora) o en una estrategia de "selección de la diana" en la que el SHAL se une a una molécula efectora antes de su utilización para obtener una molécula quimérica.

Por molécula quimérica o composición quimérica o fracción quimérica se entiende una molécula o composición en la que dos o más moléculas que existen por separado en su estado natural se unen para formar una única molécula que tiene la funcionalidad deseada de las moléculas que la componen. Típicamente, una o más de las moléculas que componen una molécula quimérica es una "molécula de selección de diana", en este caso uno o más SHAL. La molécula de selección de diana actúa para dirigir la molécula quimérica a su diana concreta (por ejemplo, una célula cancerígena).

Otro componente de la molécula quimérica es un "efector". Por molécula efectora se entiende una molécula o grupo de moléculas que se transporta específicamente hasta la diana (por ejemplo, una célula cancerígena). Cabe señalar que en este contexto dicho transporte específico no tiene que ser necesariamente hasta una célula cancerígena, sino que basta simplemente con que proporcione una administración preferencial del efector en la célula cancerígena con respecto a las células sanas normales.

La molécula efectora típicamente tiene una actividad característica que se ha de administrar a la célula diana. Entre las moléculas efectoras se incluyen, entre otras, citotoxinas, etiquetas, radionúclidos, ligandos, anticuerpos, fármacos, liposomas, nanopartículas, partículas virales, citoquinas y similares.

En determinadas realizaciones, el efector es una etiqueta detectable, donde las etiquetas detectables preferibles incluyen radionúclidos. Entre los radionúclidos y etiquetas útiles en los conjugados de radionúclido-quelante (por ejemplo, biotina) de la presente invención, los emisores de gamma, emisores de positrones, emisores de rayos X y emisores de fluorescencia resultan adecuados para la localización, el diagnóstico y/o la determinación de la fase, y/o la terapia, mientras que los emisores de beta y alfa y los agentes de captura de electrones y neutrones, como el boro y el uranio, también se pueden utilizar para la terapia.

Las etiquetas detectables se pueden utilizar conjuntamente con un detector externo y/o un detector interno y proporcionar medios para localizar de forma efectiva y/o visualizar células cancerígenas de próstata. Esta detección/visualización puede resultar útil en diversos contextos que incluyen, entre otros, entornos preoperatorios e intraoperatorios. Por tanto, una determinada realización de esta invención se refiere a un método para detectar intraoperatoriamente cánceres en el cuerpo de un mamífero. Estos métodos implican típicamente la administración al mamífero de una composición que comprende, en una cantidad suficiente para la detección a través de un detector (por ejemplo, una sonda de detección de gamma), un SHAL específico del cáncer con una etiqueta detectable (por ejemplo, anticuerpos de esta invención etiquetados con un radioisótopo como ¹⁶¹Tb, ¹²³I, ¹²⁵I, y similares) y, después de dejar que la sustancia activa sea absorbida por el tejido diana, y preferiblemente después de la eliminación de la etiqueta de la sangre, someter al mamífero a una técnica de radioinmunodetección en el área correspondiente del cuerpo (por ejemplo, utilizando una sonda de detección gamma).

El SHAL unido a una etiqueta puede ser utilizado en la técnica de cirugía radioguiada, donde los tejidos correspondientes del cuerpo de un sujeto pueden detectarse y localizarse intraoperatoriamente a través de

un detector (por ejemplo, una sonda de detección de gamma). El cirujano puede, intraoperativamente, utilizar esta sonda para encontrar los tejidos en los que se ha producido la absorción del compuesto etiquetado con un radioisótopo, que es, por ejemplo, un emisor de fotones gamma de baja energía.

Además de etiquetas detectables, entre los efectores preferibles se incluyen las citotoxinas (por ejemplo, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina, toxina de difteria y similares), o fármacos citotóxicos o profármacos, en cuyo caso la molécula química puede actuar como un potente agente para matar las células que dirige específicamente la citotoxina a las células cancerígenas.

En otras realizaciones, el efector puede incluir un liposoma que encapsula un fármaco (por ejemplo, un fármaco contra el cáncer como doxirrubina, vinblastina, taxol, etc.), un antígeno que estimula el reconocimiento de la célula unida por parte de los componentes del sistema inmunitario, un anticuerpo que se une específicamente a componentes del sistema inmunitario y los dirige hasta el cáncer, y similares.

A) Determinados efectores preferibles

1) Imágenes de las composiciones

En determinadas realizaciones, las moléculas químicas de esta invención pueden utilizarse para dirigir etiquetas detectables al punto de un tumor. Esto puede facilitar la detección y/o localización de un tumor. En determinadas realizaciones particularmente preferibles, el componente efector de la molécula química es una etiqueta "radiopaca", por ejemplo una etiqueta que se puede visualizar con facilidad con rayos X. Los materiales radiopacos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los materiales radiopacos más comunes incluyen el yodo, bromo o las sales de bario. Otros materiales radiopacos también son conocidos e incluyen, entre otros, derivados orgánicos del bismuto (véase, por ejemplo, la Patente USA 5 939 045), poliuretanos radiopacos (véase, por ejemplo, la Patente USA 5 346 981, compuestos de organobismuto (véase, por ejemplo, la Patente USA 5 256 334), complejos de polímero de bario radiopacos (véase, por ejemplo, la Patente USA 4 866 132) y similares.

Los SHAL de esta invención pueden unirse directamente a la fracción radiopaca o pueden unirse a un "paquete" (por ejemplo, un quelato, un liposoma, una microperla de polímeros, etc.) que porta o contiene el material radiopaco como se describe más abajo.

Además de etiquetas radiopacas, otras etiquetas también resultan adecuadas para su uso en la presente invención. Entre las etiquetas adecuadas para su uso como componente de la molécula efectora de las moléculas químicas de la presente invención se incluye cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

Entre las etiquetas útiles de la presente invención se incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radioetiquetas (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{18}F , etc.) u otras etiquetas para la captura de imágenes, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y otras habitualmente utilizadas en un ensayo ELISA), y etiquetas colorimétricas como perlas de oro coloidal o plástico o cristal coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

Las diversas radioetiquetas preferibles incluyen, entre otras, ^{99}Tc , ^{203}Pb , ^{67}Ga ,

^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{52}Fe , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{67}Cu ,

^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , and ^{111}Ag .

Los medios para detectar estas etiquetas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, se pueden detectar radioetiquetas utilizando película fotográfica, detectores de centelleo y similares. Los marcadores fluorescentes se pueden detectar utilizando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan típicamente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las etiquetas colorimétricas se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada.

2) Radiosensibilizadores

En otra realización, el efector puede ser un radiosensibilizador que mejora el efecto citotóxico de la radiación ionizante (por ejemplo, como la que podría producir el ^{60}Co o una

fente de rayos X) sobre una célula. Se conocen numerosos agentes radiosensibilizadores e incluyen, entre otros, compuestos derivados de la benzoporfirina (véase, por ejemplo, la Patente USA 5 945 439), óxidos de 1,2,4- benzotriacina (véase, por ejemplo, la Patente USA 5 849 738), compuestos que contienen determinadas diaminas (véase, por ejemplo, la Patente USA 5 700 825), BCNT (véase, por ejemplo, la Patente USA 5 872 107), derivados de amida de ácido nitrobenzoico radiosensibilizadores (véase, por ejemplo, la Patente USA 4 474 814), diversos derivados heterocíclicos (véase, por ejemplo, la Patente USA 5 064 849), complejos de platino (véase, por ejemplo, la Patente USA 4 921 963) y similares.

3) Radioisótopos

ES 2 613 844 T3

En determinadas realizaciones, el efector comprende uno o más radioisótopos que cuando se administran a una célula diana provocan la muerte de la célula inducida por radiación.

5 Con fines médicos, los tipos de deterioro celular más importantes son la emisión de gamma, beta, alfa y la captura de electrones. Las partículas gamma emitidas por un radionúclido, como ^{131}I , salen del cuerpo, permitiendo el uso de imágenes de gammagrafía externas para determinar la biodistribución de los anticuerpos radioetiquetados (el rango de energía óptimo para la inmunogammagrafía es 100-250 keV). Por el contrario, las partículas beta depositan la mayor parte de su energía a unos cuantos milímetros del punto de deterioro. Las emisiones de beta de radionúclidos como ^{131}I o ^{90}Y que tienen como diana células tumorales positivas en antígeno pueden matar las células cercanas antígeno-negativas a través del efecto de "fuego cruzado".

10 El itrium-90, un emisor de beta puro, tiene diversas propiedades que lo convierten en una opción atractiva para la radioinmunoterapia: 1) una energía beta elevada ($E_{\text{max}}=2,29$ MeV; rango máximo de energía de partículas en tejido =11,9 mm) que le permite matar células tumorales adyacentes; 2) química de metal, que facilita la síntesis de conjugados radioisótopo-anticuerpo y el uso de un enfoque de preselección de la diana; y 3) una vida útil física lo suficientemente prolongada (2,67 días) para su uso en SHAL intactos, que pueden tardar 1-3 días en alcanzar su concentración máxima en tumores.

20 En determinadas realizaciones, el efector puede incluir un emisor alfa, es decir un isótopo radiactivo que emite partículas alfa y/o emisor electrón Auger. Recientemente se ha demostrado que los emisores alfa y los emisores electrón Auger resultan efectivos en el tratamiento del cáncer (véase, por ejemplo, Bodei *et al.* (2003) *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 18:861). Los emisores alfa adecuados incluyen, entre otros, ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , y similares.

La Tabla 4 ilustra algunos radionúclidos adecuados para la radioinmunoterapia.

La lista se ofrece a título ilustrativo y sin carácter limitador.

25 Tabla4: Ejemplos ilustrativos de radionúclidos adecuados para radioinmunoterapia.

Radio núclido	Modo deterioro	Vida 1 física	Energía particulada máx. (%)	Ventajas	Desventajas
1-131	β, γ	8d	807 keV (1)* 606 keV (86)* 336 keV(13)*	Química yodo, económico	Deshalogenación, preocupaciones seguridad radiación
Cu-67	β, γ	62h	577keV (20)* 484 keV (35)* 395 keV(45)*	Imágenes, química metal, larga retención en tumor	Escaso
Lu-177	β, γ	6.7d	497keV (90)* 384 keV (3)* 175 keV(7)*	Imágenes	Escaso, detector hueso
Re-186	β, γ electrón captura	91h	1.07MeV (77)* 934 keV (23)*	Química $^{99\text{m}}\text{Tc}$	Escaso
Y-90	β	64h	2,29 MeV (100)*	Química metal	Sin imágenes, detector hueso
Re-188	β	17h	2,13 MeV (100)*		Escaso, vida útil corta
Bi-212	α, β	1h	6,09 MeV (27)**		Sin imágenes, vida útil corta, producto obtenido inestable

At-211	α, captura de electrón	7h	5,87 MeV (100)**	RBE elevada, hipoxia, menos importante, rango corto	Sin imágenes, vida útil corta, producto obtenido inestable
1-125	captura de electrón	60d	35 keV (100)	Rango corto	Sin imágenes, vida útil larga

* irradiación beta

** irradiación alfa

RBE, efectividad biológica relativa

4) Ligandos

- 5 En diversas realizaciones, la molécula efectora también puede ser un ligando, un marcador de epítipo o un anticuerpo. En particular, el ligando y los anticuerpos preferibles son aquellos que se unen a los marcadores de superficie de las células inmunes. Las moléculas químicas que utilizan estos anticuerpos como moléculas efectoras actúan como enlazadores bifuncionales que establecen una asociación entre las células inmunes que portan el vinculante de unión para el ligando o el anticuerpo y la célula o células del cáncer de próstata.

5) Quelatos

- 15 Muchos de los productos farmacéuticos y/o radioetiquetas descritos aquí se proporcionan preferiblemente en forma de quelatos, en particular cuando se utiliza una estrategia de preselección de la diana. La molécula quelante se une típicamente a una molécula (por ejemplo, biotina, avidina, estreptavidina, etc.) que se une específicamente a un marcador de epítipo unido a un anticuerpo específico para el cáncer de próstata de esta invención.

- 20 Los grupos quelantes son bien conocidos por los expertos en la técnica. En determinadas realizaciones, los grupos quelantes se obtienen de ácido diamina tetra-acético (EDTA), ácido dietileno triamina penta-acético (DTPA), ácido ciclohexil 1,2-diamina tetra-acético (CDTA), ácido etilenglicol-0,0'-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetra-acético (EGTA), ácido N,N- bis(hidroxi-bencil)-etilendiamina-N,N'-diacético (HBED), ácido trietileno tetramina hexa-acético (TTHA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetra-acético (DOTA), ácido hidroxietildiamina triacético (HEDTA), ácido 1,4,8,11-tetra-azacicotetradecano-N,N',N'',N'''-tetra-acético (TETA), DTPA sustituido, EDTA sustituido y similares (véase, por ejemplo, la Figura 22).

- 25 Entre los ejemplos de determinados quelantes preferibles se incluyen 2-iminotiolanos y 2-iminotiociclohexanos, no sustituidos o sustituidos, en particular 2-imino-4-mercaptometiltiolano.

Un agente quelante, el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N, N'', N'''-tetraacético (DOTA), resulta de particular interés por su capacidad para quelar una serie de metales importantes desde el punto de vista diagnóstico y terapéutico, tales como radionúclidos y radioetiquetas.

- 30 Se han descrito conjugados de DOTA y proteínas, tales como anticuerpos. Por ejemplo, la Patente USA n.º 5 428 156 explica un método para conjugar DOTA con anticuerpos

y fragmentos de anticuerpos. Para producir estos conjugados, un grupo de ácido carboxílico de DOTA se convierte en un éster activo que puede reaccionar con un grupo amino o sulfhidrilo del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Lewis *et al.* (1994) *Bioconjugate Chem.* 5: 565-576, describe un método similar

en el que un grupo carboxilo del DOTA se convierte en un éster activo, y el DOTA activado se mezcla con un anticuerpo, uniendo el anticuerpo al DOTA a través del grupo épsilon-amino de un residuo de lisina del anticuerpo, convirtiendo así un grupo carboxilo del DOTA en una fracción amida.

5 Alternativamente, el agente quelante se puede unir, directamente o a través de un enlazador, a un marcador de epítipo o a una fracción que se une a un marcador de epítipo. Se han descrito conjugados de DOTA y biotina (véase, por ejemplo, Su (1995) *J. Nucl. Med.*, 36 (5 Supl):154P, que divulga la unión de DOTA con biotina a través de derivados de la biotina con una cadena lateral amino, tales como DOTA-LC-biotina o DOTA-bencil-4-(6-amino-caproamida)-biotina). Yau *et al.*, WO 95/15335, divulgan un método para producir compuestos de nitro-bencil-DOTA que se pueden conjugar con biotina. El método
10 comprende una reacción de ciclización a través de la proyección transitoria del grupo hidroxilo; tosilación de una amina; desprotección del grupo hidroxilo transitoriamente protegido; tosilación del grupo hidroxilo desprotegido; y ciclización del tosilo intramolecular. Wu *et al.* (1992) *Nucl. Med. Biol.*, 19(2):239-244 divulgan una síntesis de 5 agentes quelantes macrocíclicos para radioetiquetar proteínas con ^{111}In e ^{90}Y . Wu *et al.* producen un conjugado de DOTA-biotina etiquetado para estudiar la estabilidad y biodistribución de conjugados con avidina, un modelo de proteína para los estudios. Este conjugado se produjo utilizando una hidrazida de biotina que contenía un grupo amino libre para reaccionar con un derivado de DOTA
15 activado generado *in situ*.

Cabe señalar que el agente quelante macrocíclico ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) se une a ^{90}Y y ^{111}In con una estabilidad extraordinaria. Los estudios cinéticos en
20 tampones seleccionados para calcular los tipos de reacción del radioetiquetado en un etiquetado radiofarmacéutico prospectivo se pueden realizar para determinar las condiciones óptimas de radioetiquetado para proporcionar elevados rendimientos del producto coherentes con los requisitos de la FDA

para un producto radiofarmacéutico. Cabe señalar asimismo que los protocolos para producir quelatos
25 Yttrio-90-DOTA se describen detalladamente en Kukis *et al.* (1998) *J. Nucl. Med.*, 39(12):2105-2110.

6) Citotoxinas

Los SHAL de la presente invención se pueden utilizar para proporcionar una variedad de fármacos
30 citotóxicos, incluyendo fármacos terapéuticos, un compuesto que emite radiación, moléculas de plantas, proteínas biológicas de origen fúngico o bacteriano y mezclas de estos. Los fármacos citotóxicos pueden ser fármacos citotóxicos que actúan a nivel intracelular, como emisores de radiación de corto alcance, entre los que se incluyen, por ejemplo, emisores alfa de alta energía y corto alcance como los anteriormente descritos o inhibidores de enzimas.

Entre los ejemplos de toxinas y fragmentos de estas enzimáticamente activos se incluyen el fragmento A
35 de la toxina de la difteria, fragmentos activos no vinculantes de toxina de la difteria, exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, determinadas proteínas de *Aleurites fordii* proteins, determinadas proteínas de Dianthin, proteínas de *Phytolacca americana* (PAP, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Morodica charantia*, curcina, crocina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogillina, restrictocina, fenomicina y enomicina, entre otros.

Entre las citotoxinas particularmente preferibles se incluyen las exotoxinas de *Pseudomonas* exotoxinas,
40 toxinas de difteria, ricina y abrina. La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis proteínica en células eucariotas a través de la inactivación del factor de elongación 2 (EF-2) catalizando su ADP-ribosilación (catalizando la transferencia de la fracción ADP-ribosil de la NAD oxidada en el EF-2).

La toxina contiene tres dominios estructurales que actúan conjuntamente para causar la citotoxicidad. El
45 dominio Ia (aminoácidos 1-252) media en la unión de la célula. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación en el citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) media en la ribosilación de ADP del factor de elongación 2 que inactiva la proteína y provoca la muerte celular. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) todavía no se ha definido, aunque una gran parte de este (aminoácidos 365-380) se puede eliminar sin pérdida de citotoxicidad (véase, por ejemplo, Siegall *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 14256-14261).

Cuando el SHAL está unido a la PE, una molécula preferible de PE es aquella en la que el dominio Ia
50 (aminoácidos 1 a 252) es eliminado y los aminoácidos 365 a 380 han sido eliminados del dominio Ib. Sin embargo, tanto el dominio Ib como una porción del dominio II (aminoácidos 350 a 394) pueden ser eliminados, en particular si las secuencias eliminadas son sustituidas por un péptido de unión como GGGGS (SEC. ID N.º: 20).

Por otra parte, las moléculas de PE también se pueden modificar utilizando mutagénesis dirigida al punto
u otras técnicas conocidas, con el objeto de alterar la molécula para una aplicación deseada concreta. También se pueden utilizar medios para alterar la molécula de PE de forma que no afecte sustancialmente

60 a las ventajas funcionales que proporcionan las moléculas de PE descritas aquí y se pretende que estas moléculas resultantes estén cubiertas en este documento.

Para las máximas propiedades citotóxicas de una molécula de PE preferible, se recomiendan varias modificaciones de la molécula. Una secuencia terminal carboxilo adecuada para la molécula recombinante resulta preferible para translocar la molécula en el citosol de las células diana. Entre las secuencias de aminoácidos que se ha descubierto que son efectivas se incluyen, REDLK (SEC. ID. N.º: 21) (como en la PE nativa), REDL (SEC. ID. N.º: 22), RDEL (SEC. ID. N.º: 23) o KDEL (SEC. ID. N.º: 24), las repeticiones de estas, u otras secuencias que funcionan para mantener o reciclar proteínas en el retículo endoplasmático, denominadas aquí "secuencias de retención endoplasmática". Véase, por ejemplo, Chaudhary *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:308-312 y Seetharam *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:17376-17381. Las formas preferibles de PE comprenden la molécula de PE designada PE38QQR. (Debinski *et al. Bioconj. Chem.*, 5:40 (1994)), y PE4E (véase, por ejemplo, Chaudhary *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.*, 265:16306).

Los métodos para clonar genes que codifican PE y para unir estas citotoxinas a las fracciones de selección de diana son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Siegall *et al.* (1989) *FASEB J.*, 3: 2647-2652; y Chaudhary *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 84: 4538- 4542, y las referencias de estos).

Al igual que la PE, la toxina de difteria (DT) mata las células mediante ribosilación de ADP del factor de elongación 2, inhibiendo así la síntesis proteínica. Sin embargo, la toxina de la difteria se divide en dos cadenas, A y B, unidas por un puente de disulfuro. A diferencia de la PE, la cadena B de DT, que se encuentra en el extremo carboxilo, es responsable de la unión del receptor y la cadena A, que se encuentra presente en el extremo amino, contiene la actividad enzimática (Uchida *et al.*(1972) *Science*, 175:901-903;

Uchida *et al.* (1973) *J. Biol. Chem.*, 248:3838-3844).

En realizaciones preferibles, el SHAL-moléculas quiméricas de la toxina de la difteria

de esta invención tiene el dominio de unión del receptor nativo eliminado mediante truncamiento de la cadena B de la toxina de la difteria. Particularmente preferible resulta la DT388, una DT en la que se elimina la secuencia terminal carboxilo que comienza en el residuo 389. Chaudhary *et al.* (1991) *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 180: 545-551. Al igual que las citotoxinas quiméricas de PE, las moléculas de DT se pueden conjugar químicamente con el anticuerpo específico del cáncer de próstata, pero en determinadas realizaciones preferibles el anticuerpo se fusionará con la toxina de la difteria por medios recombinantes (véase, por ejemplo, Williams *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 11885-11889).

7)Partículas virales

En determinadas realizaciones, el efector comprende una partícula viral. El SHAL

se puede conjugar con la partícula viral, por ejemplo a través de una proteína expresada en la superficie de la partícula viral (por ejemplo, un fago filamentosos). La partícula viral puede incluir adicionalmente un ácido nucleico que se pretende administrar a la célula diana (cáncer de próstata). El uso de partículas virales para administrar ácidos nucleicos a las células se describe en detalle en WO 99/55720.

8) Otras fracciones terapéuticas

Otras moléculas efectoras adecuadas incluyen agentes farmacológicos o sistemas de encapsulación que contienen diversos agentes farmacológicos. De este modo, el SHAL se puede unir directamente a un fármaco que se va a administrar directamente en el tumor. Estos fármacos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, entre otros, doxorubicina, vinblastina, genisteína, una molécula antisentido y similares.

Alternativamente, la molécula efectora puede comprender un sistema de encapsulación, como una cápside vírica, un liposoma, o una micela que contiene una composición terapéutica como un fármaco, un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido u otro ácido nucleico que se pretende administrar a la célula) u otra fracción terapéutica que está preferiblemente protegida frente a la exposición directa al sistema circulatorio. Los medios de preparación de liposomas unidos a anticuerpos son bien

conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente USA n.º 4 957 735, Connor *et al.* (1985) *Pharm. Ther.*, 28: 341-365) y se pueden utilizar métodos similares para unir los SHAL.

B)Unión del SHAL al efector

Un experto en la técnica apreciará que los SHAL de esta invención y la molécula o moléculas efectoras se pueden unir en cualquier orden. Así, en diversas realizaciones, el efector se puede unir a cualquier ligando que comprende el SHAL y/o al enlazador que se une a los diversos ligandos que comprenden el SHAL.

Al SHAL y el efector se puede unir cualquier número de medios bien conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente el efector se conjuga, directamente o a través de un enlazador (separador), con el SHAL.

En una realización, el SHAL se conjuga químicamente con la molécula efectora (por ejemplo, una citotoxina, una etiqueta, un ligando, o un fármaco o liposoma, etc.). Los medios para conjugar químicamente las moléculas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

5 El procedimiento para unir un efector con un SHAL variará en función de la estructura química del efector y/o el SHAL. Los ligandos comprendiendo el SHAL

y/o el enlazador que se une a los ligandos pueden contener una variedad de grupos funcionales; por ejemplo, ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH₂), hidroxil (-OH), tiol (-SH), y otros grupos, que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado de una molécula efectora o de un enlazador unido a la molécula efectora para unir efectivamente el efector al SHAL.

10 Alternativamente, el ligando o los ligandos que comprenden el SHAL y/o el enlazador que se une a los ligandos se pueden derivatizar para exponer o unir los grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas enlazadoras como las descritas anteriormente para unir los ligandos entre sí.

15 En algunas circunstancias, resulta deseable liberar el efector del SHAL cuando la molécula quimérica ha alcanzado su punto diana. Por tanto, los conjugados quiméricos que comprenden enlaces que son clivables, por ejemplo, en los alrededores del punto diana se pueden utilizar cuando el efector se va a liberar del SHAL. El clivaje del enlace para liberar el agente del anticuerpo se puede provocar mediante la actividad enzimática o por las condiciones a las que está sometido el conjugado, por ejemplo dentro de la célula diana o en los alrededores del punto diana. Cuando el punto diana es un tumor, se puede utilizar un
20 enlazador que es clivable en las condiciones presentes en el punto del tumor (por ejemplo, cuando está expuesto a enzimas asociadas al tumor o pH ácido).

En determinados ejemplos, el enlazador clivable puede ser un péptido que se puede someter a proteólisis. En determinadas realizaciones, el enlazador clivable comprende un péptido que tiene un punto de reconocimiento para una proteasa.

25 Una serie de enlazadores diferentes son conocidos por los expertos en la técnica.

Véanse las Patentes USA N.º 4 618 492, 4 542 225 y 4 625 014. Los mecanismos para la liberación de un agente de estos grupos de enlazadores incluyen, por ejemplo, la irradiación de un enlace fotolábil y la hidrólisis ácida catalizada. La Patente USA n.º 4 671 958, por ejemplo, incluye una descripción de
30 inmunconjugados que comprenden enlazadores que son clivados en el punto diana *in vivo* por las enzimas proteolíticas del sistema del complemento del paciente. En vista del gran número de métodos que se han documentado para conseguir una variedad de compuestos de radiodiagnóstico, compuestos radioterapéuticos, fármacos, toxinas y otros agentes para anticuerpos, un experto en la técnica será capaz de determinar un método adecuado para unir un agente dado a un anticuerpo u otro polipéptido.

1) Conjugación de quelatos

35 En determinadas realizaciones preferibles, el efector comprende un quelato que se une a un anticuerpo o a un marcador de epítipo. El SHAL específico del cáncer porta el correspondiente marcador de epítipo o anticuerpo para que el simple contacto del SHAL con el quelato provoque la unión del SHAL al efector. El paso de combinación se puede realizar antes de utilizar la fracción (estrategia de selección de diana) o el tejido diana se puede unir al SHAL antes de administrar el quelato. Los métodos para producir quelatos
40 apropiados para la unión a diversas fracciones de selección de diana son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes USA n.º 6 190 923, 6 187 285, 6 183 721, 6 177 562, 6 159 445, 6 153 775, 6 149 890, 6 143 276, 6 143 274, 6 139 819, 6 132 764, 6 123 923, 6 123 921, 6 120 768, 6 120 751, 6 117 412, 6 106 866, 6 096 290, 6 093 382, 6 090 800, 6 090 408, 6 088 613, 6 077 499, 6 075 010, 6 071 494, 6 071 490, 6 060 040, 6 056 939, 6 051 207, 6 048 979, 6 045 821, 6 045 775,
45 6 030 840, 6 028 066, 6 022 966, 6 022 523, 6 022 522, 6 017 522, 6 015 897, 6 010 682, 6 010 681, 6 004 533, 6 001 329 y similares).

(c) SHAL que inhiben receptores, enzimas y otras biomoléculas

En determinadas realizaciones, esta invención proporciona SHALs que inhiben la actividad de enzimas, receptores o la actividad de otras biomoléculas. Típicamente estos SHAL comprenden ligandos que se
50 unen a diferentes puntos alrededor o cerca del punto activo o del punto de unión de la enzima o el receptor. En determinadas realizaciones, los ligandos se seleccionan para unirse a una primera hendidura y una segunda hendidura de la enzima, el receptor u otra proteína de unión, donde la primera y la segunda hendidura flanquean los lados opuestos del punto activo o punto de unión de dicha enzima, receptor u otra proteína de unión, o donde la primera hendidura comprende o está ubicada en el punto
55 activo y la segunda hendidura se encuentra cerca/adyacente a la primera hendidura, o cualquiera de las hendiduras o ambas se encuentran en el punto o lo suficientemente cerca del punto utilizado por la proteína, la enzima o receptor para unirse a otra molécula, de forma que la unión de un ligando a una de las hendiduras o a ambas interrumpe o bloquea la unión de la enzima, el receptor u otra biomolécula con su ligando afín. Cuando el SHAL se pone en contacto con su diana, se une a la diana efectivamente
60 bloqueando el punto activo y/o el punto de unión, inhabilitando así la actividad de la enzima, el receptor u otra biomolécula.

IV) Composiciones farmacéuticas

Los SHAL y/o quelatos y/o moléculas quiméricas de esta invención (en particular aquellos específicos para el cáncer u otras células patológicas) resultan útiles para la administración parenteral, tópica, oral o local (por ejemplo, inyectada en el punto de un tumor), administración mediante aerosol o transdérmica, con fines profilácticos, aunque principalmente para el tratamiento terapéutico.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en diversas formas de dosis unitarias, dependiendo del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosis unitarias adecuadas para la administración oral incluyen formulaciones en polvo, comprimidos, píldoras, cápsulas y pastillas. Se reconoce que las composiciones farmacéuticas de esta invención, cuando se administran por vía oral, pueden estar protegidas de la digestión. Esto se consigue típicamente produciendo un complejo con el componente activo (por ejemplo, el SHAL, la molécula quimérica, etc.) y una composición para hacerlo resistente a la hidrólisis ácida y enzimática o encapsulando el ingrediente(s) activo en un vehículo convenientemente resistente como un liposoma. Los medios para proteger los componentes frente a la digestión son bien conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención resultan particularmente útiles para la administración parenteral, como la administración intravenosa o la administración en una cavidad corporal o el lumen de un órgano. Las composiciones para la administración comprenderán normalmente una solución del SHAL y/o la molécula quimérica disuelta en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se pueden utilizar diversos vehículos acuosos, por ejemplo una solución tampón salina y similares. Estas soluciones son estériles y por lo general no contienen materia no deseada. Estas composiciones se pueden esterilizar utilizando técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Estas composiciones pueden contener las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables necesarias para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como agentes de ajuste del pH y tampón, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, tales como acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración de la molécula quimérica en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará sobre todo basándose en los volúmenes del fluido, las viscosidades, el peso corporal y similares conforme con el modo de administración particular seleccionado y de las necesidades del paciente.

Por tanto, una composición farmacéutica típica para administración intravenosa

sería de entre 0,1 y 10 mg por paciente y día. Se pueden utilizar dosis de entre 0,1 y unos 100 mg por paciente y día, particularmente cuando el fármaco se administra en un punto apartado y no en el torrente sanguíneo, como una cavidad corporal o el lumen de un órgano. Los métodos reales para preparar composiciones de administración parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen más detalladamente en publicaciones como *Remington's Pharmaceutical Science*, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980).

Las composiciones que contienen los SHAL y/o moléculas quiméricas del presente

o un cóctel de estos (es decir, con otros terapéuticos) se pueden administrar para tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que sufre una enfermedad, como un cáncer, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. La cantidad adecuada para conseguirlo se define como "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado de salud general del paciente.

Se pueden realizar administraciones únicas o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosis y la frecuencia necesarias y toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición deberá proporcionar una cantidad suficiente de los SHAL para tratar efectivamente al paciente.

Un experto en la técnica apreciará que hay algunas regiones que no están muy vascularizadas o que están protegidas por células unidas mediante uniones sólidas y/o mecanismos de transporte activo que reducen o impiden la entrada de macromoléculas presentes en el torrente sanguíneo.

Un experto en la técnica apreciará que en estos casos, las composiciones terapéuticas de esta invención se pueden administrar directamente en el punto del tumor. Así, por ejemplo, los tumores cerebrales se pueden tratar administrando la composición terapéutica directamente en el punto del tumor (por ejemplo, a través de un catéter implantado quirúrgicamente).

Alternativamente, la composición terapéutica se puede administrar en el punto diana mediante una formulación de liberación lenta. Estas formulaciones pueden incluir, por ejemplo, una esponja biocompatible u otro material de matriz inerte o reabsorbible impregnado con la composición terapéutica, cápsulas o microcápsulas de liberación diferida con disolución lenta y similares.

Típicamente el catéter o la formulación de liberación diferida se colocará en el punto del tumor como parte de un procedimiento quirúrgico. Así, por ejemplo, cuando se extraiga quirúrgicamente una masa tumoral importante, el catéter de perfusión o la formulación de liberación diferida se puede emplazar en el punto del tumor como terapia adicional. Por supuesto, la extirpación quirúrgica de la masa tumoral puede

resultar no deseable, no necesaria o imposible, en cuyo caso la administración de las composiciones terapéuticas de esta invención puede representar la modalidad terapéutica principal.

V. Kits.

5 Cuando se utiliza un radiactivo u otro efector como agente de diagnóstico y/o terapéutico, a menudo resulta imposible poner a disposición del usuario la composición preparada para ser utilizada, debido a la reducida vida útil del compuesto radioetiquetado y/o del radionúclido empleado. En estos casos el usuario puede realizar la reacción de etiquetado con el radionúclido en el hospital clínico, en la consulta del médico o en el laboratorio. A tal efecto, o con otros fines, los diversos ingredientes de reacción se pueden ofrecer al usuario en forma de lo que se denomina un "kit". El kit está preferiblemente diseñado para que 10 las manipulaciones necesarias para realizar la reacción deseada sean lo más sencillas posibles, de forma que el usuario pueda preparar con el kit la composición deseada utilizando las instalaciones de las que dispone. Por tanto, la invención se refiere también a un kit para preparar una composición según esta invención.

Este kit según la presente invención comprende preferiblemente un SHAL

15 como el que aquí se describe. El SHAL se puede proporcionar, si se desea, con un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable y/o se añaden agentes de formulación y/o adyuvantes. Por otra parte, el kit incluye opcionalmente una solución de una sal o un quelato de un radionúclido adecuado (u otro agente activo), e (iii) instrucciones de uso con una prescripción para la administración y/o reacción de los ingredientes presentes en el kit.

20 El kit que se proporcionará al usuario también puede comprender el ingrediente(s) anteriormente definido, junto con instrucciones de uso, donde la solución de una sal o quelato del radionúclido que pueda tener una vida útil limitada se podrá poner a disposición del usuario por separado.

25 El kit puede contener, opcional o adicionalmente, un agente reductor y/o, si se desea, un quelato y/o instrucciones de uso de la composición y/o una prescripción para hacer reaccionar los ingredientes del kit para obtener la forma del producto o los productos deseados. Si se desea, los ingredientes del kit se pueden combinar, siempre que sean compatibles.

En determinadas realizaciones, la reacción para formar el complejo con el SHAL se puede producir simplemente combinando los componentes en un medio neutro y provocando su reacción. A tal efecto, el efector se puede presentar al SHAL en forma de un quelato.

30 Cuando se utiliza el integrante(s) del kit como componente(s) para la administración farmacéutica (por ejemplo, en forma de líquido inyectable) estará preferiblemente en condiciones de esterilidad. Cuando el integrante(s) se suministra en estado seco, el usuario deberá utilizar preferiblemente una solución de suero fisiológico estéril como solvente. Si se desea, el integrante(s) se puede estabilizar de forma convencional con estabilizadores adecuados, tales como ácido ascórbico, ácido gentsico o sales de estos 35 ácidos, o puede comprender otros agentes auxiliares, por ejemplo compuestos de relleno, como glucosa, lactosa, manitol y similares.

Aunque los materiales de instrucción, cuando se incluyen, comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a eso. Cualquier medio capaz de recopilar estas instrucciones y comunicarlas a un usuario final se contempla en la presente invención.

40 Estos medios incluyen, entre otros, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (CD ROM) y similares. Estos medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan estos materiales de instrucción.

EJEMPLOS

45 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, sin carácter limitador, la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Creación de SHAL específicos para HLA-DR10

50 Los estudios preclínicos y clínicos han revelado que la región epitópica (región única reconocida por los anticuerpos) de la subunidad beta del HLA-DR10 y las proteínas de la superficie celular del complejo mayor de histocompatibilidad HLA-DR relacionado resultan dianas particularmente atractivas para la terapia radioisotópica sistémica para las leucemias y linfomas de células B y aportan otras oportunidades para el tratamiento y prevención del cáncer. A pesar de que el HLA-DR10 tiene características en común con otras proteínas de superficie de las células B, como CD20, que lo convierten en una diana adecuada, presenta características diferenciadas que consideramos que lo dotan de un gran atractivo.

55 Al igual que el antígeno CD20, la proteína del HLA-DR se encuentra localizada en la superficie de los linfocitos B, persiste durante toda la diferenciación de las células B, pero desaparece durante la transformación del linfocito a la fase de célula plasmática (Epstein *et al.* (1987) *Cancer Res.*, 47:830-840).

El epítipo del antígeno de Lym-1 discreto aparece en los precursores de células B comprometidos, pero no se expresa con anterioridad durante el desarrollo de las células B. Además, no se encuentra generalmente en células T ni en otras células normales. La expresión de moléculas del MHC de clase 2 en las células B se controla durante el desarrollo. Las células tempranas y pre-B son ARNm clase 2 negativas y no se pueden inducir para expresar antígenos de clase 2. El antígeno del HLA-DR se adquiere durante la fase tardía de la célula pre-B. Dado que el nivel basal de expresión de clase 2 en las células B es aproximadamente 100 veces menor que la que se encuentra en las líneas de células B malignas (Rose *et al.* (1996) *Cancer Immunol Immunother.*, 43:26-30.; Rose *et al.* (1999) *Mol Immunol.*, 36:789-797), esto explica la observación de que solamente se necesitan 50 mg de anticuerpo Lym-1 para llegar a una diana de linfoma maligno extravascular (DeNardo *et al.* (1998) *J Clin Oncol.*, 16:3246-3256), mientras que se requieren 50 mg de CD22 y cientos de mg de anticuerpos CD20 debido a la densidad de los antígenos de CD22 y CD20 en los linfocitos normales (Press (1999) *Semin Oncol.*, 26:58-65; Knox *et al.* (1996) *Clin Cancer Res.*, 2:457-470). La dosis de tratamiento de yodo-131, cobre-67 o itrio-90 unida a pequeñas cantidades de Lym-1 cura a la mayoría de los ratones con xenoinjertos de Raji (DeNardo *et al.* (1991) *Antibody Immunoconj Radiophar.*, 4:777-785; DeNardo *et al.* (1997) *Clin Cancer Res.*, 3:71-79), la línea de células de linfoma maligno de Burkitt utilizada como inmunógeno para generar Lym-1 (Epstein *et al.* (1987) *Cancer Res.*, 47: 830-840). Similarmente, estos radiofármacos, en ensayos de fase I/II en pacientes con linfoma no Hodgkin de células B y un subconjunto de pacientes con leucemia linfocítica crónica, han inducido un elevada y duradera tasa de respuesta, con remisiones completas frecuentes y algunas supervivencias a largo plazo cuando se utilizan como terapia de agente único. El HLA-DR proporciona la identificación de las células y los péptidos antigénicos se muestran en el HLA-DR. Esto puede explicar supervivencias inusualmente prolongadas en un subconjunto de nuestros pacientes con linfoma agresivo en los que se ha documentado una cascada de anticuerpos idiotípicos, incluyendo anticuerpos policlonales humanos citotóxicos para células Raji y tumores Raji (1998) *Cancer Biother Radiopharm.*, 13:1-12; Lamborn *et al.* (1997) *Clin Cancer Res.*, 3:1253-1260).

Sin embargo, a pesar de que estos anticuerpos funcionan, todavía es necesario mejorarlos. El anticuerpo es una macromolécula que penetra las barreras vasculares y el tumor de forma deficiente e interactúa con diversos receptores, lo que limita su selectividad como vehículos de radioisótopos y se suma a su perfil de eventos adversos. La inmunogenicidad de reactivos basados en anticuerpos se puede minimizar, pero no eliminar, utilizando anticuerpos "humanizados" (Brown *et al.* (2001) *Clin Lymphoma.*, 2:188-90; Kostelny *et al.* (2001) *Int J Cancer*, 93:556-65; Leonard *et al.* (2002) *Semin Oncol.*, 29:81-6; Lundin *et al.* (2002) *Blood*, 100:768-73; Ligibel y Winer (2002) *Semin Oncol.*, 29:38-43). La inmunogenicidad se puede evitar creando reactivos de base no proteínica. Los anticuerpos completos también exhiben una reactividad apreciable (por ejemplo, interacciones de Fc) con células no diana, lo que reduce la selectividad y aumenta los eventos adversos. Incluso las pequeñas mejoras de la selectividad del agente de selección de diana se pueden utilizar para minimizar los daños colaterales y mejorar el índice terapéutico del fármaco.

Lym-1 es un anticuerpo monoclonal IgG-2a marino (MAb) que se une selectivamente a una proteína altamente expresada en la superficie de las células B humanas malignas (Epstein *et al.* (1987) *Cancer Res.*, 47: 830-840). Hemos mostrado que un epítipo discreto de HLA-DR10 fue el antígeno original en células Raji que generó el MAb Lym-1 y que este epítipo no es compartido por todos los subtipos de HLA-DR (Rose *et al.* (1996) *Cancer Immunol Immunother.*, 43: 26-30; Rose *et al.* (1999) *Mol Immunol.*, 36: 789-797). Nuestros datos sugieren que los residuos de unión críticos de Lym-1 se deben a las 19 diferencias en la secuencia de aminoácidos entre la subunidad beta de HLA-DR10 reactiva y las subunidades beta de HLA-DR3 y HLA-DR52 no reactivas prácticamente idénticas. Esto explica la selectividad del epítipo o el punto de unión de Lym-1 entre los HLA-DR que contienen glóbulos blancos, al tiempo que sienta la base de la existencia de esta proteína en prácticamente todos los pacientes con células B malignas. De los 19 residuos que comprende la región de unión crítica de Lym-1, solo los aminoácidos Q70 a R70, seguidos de R71 se encontraron en todas las muestras reactivas a Lym-1 y estaban ausentes en las muestras no reactivas a Lym-1. En muchas de las moléculas de HLA-DR no reactivas, estos dos residuos fueron a menudo sustituidos por D70 y/o E71. La hipótesis de que los subtipos que contienen los residuos de unión supuestamente críticos de Lym-1 (Q/R70-R71) serían los más reactivos se ha confirmado en una serie de estudios, incluyendo amplios ensayos de citotoxicidad realizados en líneas de células linfoblastoides de células de tipo B y T, incorporando 31 genotipos de HLA-DR (Rose *et al.* (1999) *Mol Immunol.*, 36: 789-797). Todas las células fuertemente reactivas expresaban al menos un alelo de HLA-DR que contenía Q/R70-71, mientras que ninguna de las líneas de células menos reactivas expresaba esa secuencia en la posición 70-71 de la cadena beta. Los ensayos citotóxicos también demostraron que las primeras se veían drásticamente más afectadas que las segundas (*Id.*). A pesar de que Lym-1 reaccionó con los linfocitos de la sangre periférica de donantes sanos, las avidencias eran muy inferiores, lo que concuerda con una menor densidad de la proteína del HLA-DR en los linfocitos normales y con la hipótesis de que se puede producir una unión univalente en lugar de bivalente, lo que explica también la selectividad de Lym-1 por las células malignas en pacientes con linfoma (*Id.*). Por tanto, parece que tanto los residuos de glutamina/arginina críticos de Lym-1 como el umbral de densidad del antígeno contribuyen a la selectividad de la unión de Lym-1 con las células B malignas frente a los linfocitos normales. En cualquier caso, los datos confirman que Lym-1 se une preferentemente a las células linfoblastoides frente a los PBL normales, lo que supone una atractiva diferencia con respecto a otras proteínas que tienen como diana las células B malignas (*Id.*).

Nuestra experiencia con la CMRIT nos ha permitido apreciar las complejidades de implementación y darnos cuenta de que muchos pacientes con NHL avanzado no pueden ser tratados con BMT debido a su enfermedad y a una recogida de médula insuficiente. Por estas razones y dadas las oportunidades únicas de intensificar la dosis utilizando planteamientos novedosos para desarrollar moléculas de selección de diana que pueden mejorar drásticamente el índice terapéutico, hemos desarrollado ligandos de alta afinidad (SHAL) que imitan el ¹³¹I-yoduro en el cáncer de tiroides. El ¹³¹I-yoduro en el cáncer de tiroides, el prototipo para la radioterapia sistémica focalizada en moléculas isotópicas, ha permitido la cura del cáncer de tiroides, hasta entonces incurable, porque el ¹³¹I es atrapado rápidamente y retenido por el cáncer o excretado en la orina, lo que proporciona un índice terapéutico que se aproxima al infinito y la oportunidad de administrar radioisótopo prácticamente ilimitado sin toxicidad significativa.

Creemos que las pequeñas moléculas SHAL pueden aprovechar mejor el potencial de "RIT" y representar una extensión natural de nuestras actividades traslacionales en curso que implican al HLA-DR como diana para las moléculas de un vehículo radioisotópico a fin de administrar radioterapia sistémica. Tal y como se describe a continuación, hemos sintetizado una serie de SHAL bidentados y determinado que al menos uno de estos SHAL se une al HLA-DR10 aislado.

A) Desarrollo de un modelo informático de la estructura molecular de la subunidad beta del HLA-DR10 que contiene la región que se ha demostrado que resulta crítica para la unión del anticuerpo de Lym-1 a las células B malignas y comparación de la estructura con otras moléculas de HLA-DR.

Las estructuras de cristales de cuatro moléculas diferentes de HLA-DR estrechamente relacionadas (HLA-DR 1-4) han sido determinadas con anterioridad y depositadas en la base de datos de estructuras PDB por otros (Jardetzky *et al.* (1994) *Nature*, 368:711-718; Bolin *et al.* (2000) *J. Med. Chem.*, 43:2135-2148; Nucci *et al.* (1998) *J. Exp. Med.*, 188:1511-1520; Ghosh *et al.* (1995) *Nature*, 378:457-462). Las secuencias proteínicas de estas cuatro proteínas, HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3 y HLA-DR4, se alinearon con la secuencia de HLA-DR 10 y se compararon para identificar tanto las ubicaciones de los aminoácidos variables como aquellas regiones de la molécula de HLA-DR10 que contienen los residuos de aminoácidos que han sido identificados como el epítipo crítico del anticuerpo Lym-1 (Rose *et al.* (1996) *Cancer Immunol Immunother.*, 43:26-30; Rose *et al.* (1999) *Mol Immunol.*, 36:789-797). Esta alineación reveló que las cinco proteínas presentan un grado de similitud de la secuencia tan elevado (Figura 8) que no fuimos capaces de crear un modelo en 3D lo suficientemente preciso de la subunidad beta del HLA-DR10 mediante modelos de homología y utilizar las coordenadas del modelo para estudiar la unión del ligando utilizando el programa DOCK.

Se utilizaron dos planteamientos diferentes para crear modelos de la subunidad beta del HLA-DR10 para el uso en el docking de ligandos. El primer enfoque utilizó las coordenadas de toda la estructura del HLA-DR3 como plantilla para crear el modelo de homología, y los 19 aminoácidos que diferían entre HLA-DR3 y HLA-DR-10 fueron mutados (cambiados) en la secuencia de HLA-DR3. Las coordenadas de los cuatro aminoácidos amino-terminales, que se encuentran presentes en HLA-DR10, HLA-DR21 y HLA-DR2 pero ausentes en HLA-DR3, se obtuvieron de la estructura de HLA-DR1 y se utilizaron para completar el modelo. En el segundo enfoque se generó un modelo híbrido utilizando las coordenadas atómicas obtenidas de diferentes segmentos de las estructuras de cristales de HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4. Los segmentos específicos de las tres estructuras de cristales de HLA utilizados en el modelo fueron seleccionados basados en similitudes de sus elementos estructurales secundarios. Se generaron alineaciones de las estructuras de las secuencias utilizando los algoritmos de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) *J. Mol. Biol.*, 147:195-197), FASTA (Pearson (1991) *Genomics*, 11:635-650), BLAST y PSI-BLAST (Altschul *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402), y el eje central del modelo se creó automáticamente utilizando el sistema AS2TS (véase el punto web <http://sb9.llnl.gov/adamz/LGA/AL2TS/as2ts.html>). Las coordenadas de los cuatro residuos amino-terminales de la estructura se tomaron de la estructura de cristales IseB del HLA-DR1, los residuos 5-122 se obtuvieron de la estructura laqd del HLA-DR1, los residuos 123-170 se tomaron de la estructura 1d5m del HLA DR4, y los residuos restantes (aa171-193) se obtuvieron de la estructura lbx2 del HLA-DR2. La construcción de las regiones terminales y helicoidales, las inserciones y deleciones de aminoácidos, y las comparaciones de la estructura del modelo de plantilla se realizaron utilizando el programa LGA desarrollado en LLNL (véase el sitio web <http://predictioncenter.llnl.gov/local/lga/lga.html>). La mayoría de coordenadas de los átomos de cadena lateral se incorporaron de las cuatro plantillas estructurales (señaladas anteriormente) debido a su elevado nivel de homología. Las cadenas laterales de regiones seleccionadas del modelo de proteína se crearon utilizando el programa SCWRL (*Id.*). La minimización de energía se aplicó a ambas estructuras eliminar contactos inapropiados de las cadenas laterales y las estructuras resultantes se "optimizaron" utilizando dinámica molecular.

Los análisis de los modelos resultantes revelaron que los dos enfoques produjeron estructuras notablemente similares. La dinámica molecular ampliada aplicada pareció ofrecer ligeras mejoras adicionales. Los resultados de los modelos revelaron que la estructura de la molécula HLA-DR10 se compone de dos dominios unidos por una bisagra con uno de los residuos activos de Lym-1, V85, posicionado directamente adyacente a la bisagra (Figura 9).

Se observó que la mayoría del núcleo de la estructura relajada del HLA-DR10, en comparación con la estructura de cristales de HLA-DR3, es prácticamente idéntica (Figura 10). Los otros tres aminoácidos que

se observó que participan en la unión de Lym-1, R70, R71 y A74 (A o E en esta posición parece importante para la unión de Lym-1) se encuentran todos en la superficie expuesta de una hélice alfa larga (Figuras 9 y 10) ubicada inmediatamente adyacente a la bisagra.

B) Identificación de puntos únicos en la superficie del HLA-DR10 dentro del epítipo de Lym-1 que se pueden seleccionar como diana para la unión del ligando.

Las superficies accesibles por solvente de la proteína del HLA-DR10 y la estructura de cristales del HLA-DR3 se calcularon utilizando las coordenadas atómicas obtenidas para el HLA-DR3 del Protein Data Bank y nuestro modelo del HLA-DR10. Se examinó y comparó el punto que rodea a los tres aminoácidos principales del epítipo de Lym-1 (dentro de 6Å). Tal y como se muestra en la Figura 11, los cambios de estos tres aminoácidos en la secuencia del HLA-DR10 (Q70R, K71R, y R74A) varían tanto la distribución de la carga como la topografía de la superficie expuesta de la proteína en esta región.

Se utilizó un programa desarrollado para identificar "hendiduras" en la superficie de la proteína (SPHGEN) para identificar potenciales cavidades que podrían ser focalizadas para la unión del ligando. Los detalles de los programas utilizados se describen en el Ejemplo 2. Dos hendiduras adyacentes (cavidades) en la superficie del modelo del HLA-DR10 se seleccionaron como puntos apropiados para la unión del ligando (Figura 12), basándose en su proximidad entre sí, en los tres residuos reactivos de Lym-1 y en la exclusividad de los aminoácidos que recubren la hendidura. Un examen de las estructuras de los cristales de las otras cuatro moléculas de HLA-DR también demostró que existen hendiduras en estos puntos o en sus proximidades en cada molécula de HLA-DR, pero tal y como se esperaba (basado en las diferencias de la secuencia de aminoácidos de las cadenas peptídicas de esta región de la estructura del HLA-DR) las hendiduras presentes en cada HLA-DR difieren en tamaño, forma y en la distancia que las separa. Dado que el "panorama" de los aminoácidos que rodean estos dos puntos difieren de forma significativa en HLA-DR3 y HLA-DR10, cabría esperar que las actividades de docking realizadas en ambos puntos identificasen ligandos que se unen selectivamente a las hendiduras de HLA-DR10 pero no de HLA-DR3. Estos puntos, identificados como Punto 1 y Punto 2 y que se muestran rellenos de esferas rojas y azules en la Figura 12 flanquean ambos lados del aminoácido más importante del epítipo de Lym-1, R70. También se ha localizado y caracterizado un tercer punto único, que se puede focalizar como reserva si no se pueden identificar los ligandos adecuados que se unen al Punto 1 o Punto 2.

C) Selección computacional de una biblioteca de ligandos "virtual" para identificar pequeñas moléculas que se pueden unir a hendiduras específicas del HLA-DR10 que comprenden el epítipo de Lym-1.

El programa DOCK (UCSF) se utilizó para realizar una selección "virtual" en la base de datos de pequeñas moléculas Available Chemical Directory, a fin de identificar las 1000 moléculas principales que se prevé que se unan en las dos hendiduras únicas identificadas como Punto 1 y Punto 2. Los detalles de los procedimientos computacionales de docking se describen en el Ejemplo 2.

A continuación se inspeccionaron visualmente las 2500 principales moléculas para seleccionar en orden descendente hasta 35 moléculas para ensayos de unión en experimentos (Tabla 5). Este proceso de selección final se basó en las propiedades químicas, incluyendo interacciones hidrófobas, enlace de hidrógeno

y tamaño molecular, así como en criterios prácticos incluyendo la disponibilidad en el mercado y el coste, la facilidad de unión sintética, y la diversidad estructural general del conjunto de moléculas.

Tabla5. Ligandos que se prevé que se unan al Punto 1 de la subunidad beta del HLA-DR10 mediante docking computacional

N.º	Compuesto
1.	7-Amino-4-clorometilumarina, glicil-l-prolina amida, hidrocloreuro
2.	5-([4,6-Diclorotriazin-2-il]amino)fluorescein hidrocloreuro
3.	Ácido 2-[2-[3-Cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinil]carbohidrazonoil]benceno carboxílico
4.	Ácido 4-[[2-(4-Ciano-3-fenil-5-isoxazolil)vinil]amino]bencencarboxílico
5.	Ácido 4- [2-(2,4-Diclorofenil)hidrazino] -4-oxo-2-fenil-2-butenico
6.	Ácido 3-(2-[[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinil]oxi]anilino)-3-oxopropanoico
7.	Ácido 3-[(4-Clorobencil)tio]imidazo[1,5-a]piridina-l-carboxílico
8.	Ácido 2-[(1,1'-Bifenil]-4-ilamino)carbonil]benzoico
9.	Bis [4-(3-aminofenoxi)fenil] sulfona

10.	4,4'-Bis(4-aminofenoxi)bifenil
11.	5(6)-Carboxitetrametilrodamina n-succinimidil éster
12.	1,4-Fenilenobis [[4-(4-aminofenoxi)fenil] metanona]
13.	H-Tyr(Br-Z)-OEt
14.	7-Amino-4-clorometilcumarina, 1-alanil-l-prolina amida, hidrocloreuro
15.	5-(N'-[2-aminoetil]tioureidofluoresceína)
16.	Achatin I, sal de amonio
17.	Fmoc-Asp(OBzl)-OH
18.	Fmoc-Bip-OH
19.	Menai H535
20.	Ácido 2'-Metoxi-5'-metil-3,4,5,6-tetracloroftalanílico
21.	4-Dimetilaminoazobenceno-4'-sulfonil-l-valina
22.	BigCHAP
23.	Arg-gly-asp-thr (SEC. ID. N.º: 25)
24.	n-Alil-2- [(1 -bencil-2-oxo-1,2-dihidro-3-piridinil)carbonil] -1 - hidrazinacarbotoamida
25.	n'-Metoxi-n- [7-(4-fenoxifenil) [1,2,4] triazolo [1,5-a]pirimidin- 2- il] iminoformamida
26.	n-[[6-(4-Clorofenoxi)-3-piridil]carbonil]-n'-[3-(trifluorometil)fenil]urea
27.	n-[[6-(4-Clorofenoxi)-3-piridil]carbonil]-n'-(4-(clorofenil)urea
28.	n,n'-Difenilbenzidina
29.	Rcl sl6,963-3
30.	N,N'-bis-(4-amino-2-cloro-fenil)-tereftalamida4-[[5-(trifluorometil)piridin- 2-il] oxil] fenil N-fenilcarbamato
31.	Ácido metidiopropil etilenodiamina tetraacético
32.	N-(4-[[3-Cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinil]metil]fenil)- 4- yodobencenocarboxamida
33.	2-(4-Clorofenil)-2-[6-[(4-clorofenil)sulfanil]-3-piridacil]acetamida
34.	6-Cloro-n4-(4-fenoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina
35.	4-Amino-2-anilino-5-benzoil-3-tiofenocarbonitrilo

Este procedimiento se repitió para la identificación de 35 potenciales moléculas de unión para el Punto 2. La Tabla 6 recoge los ligandos que según las previsiones del docking molecular se unen al Punto 2.

Tabla6. Ligandos que se prevé que se unan al Punto 2 de la subunidad beta del HLA-DR10 mediante docking computacional

1.	Leu-encefalina
2.	Ácido 4-[4-(4-Clorobencil)piperazino]-3-nitrobencenocarboxílico
3.	Beta-casomorfina (1-2)
4.	L-ácido aspártico, alfa-(4,5-dimetoxi-2-nitrobencil) éster, hidrocloreuro
5.	Cefadroxilo
6.	3,3',5-Triyodo-dl-tironina
7.	H- Glu(anilida) - OH
8.	H-Trp-phe-OH
9.	Glicilglicil-D,L-fenilalanina

10.	Timopoyetina II (33-36)
11.	Ácido tiofosfórico S-(3-(3-amino-propilamino)-propil) éster, di-hidrato
12.	Dinorfina A (13-17), Porcina
13.	L-Alanil-L-alanil-L-triptófano
14.	Asp-arg-val-tyr (SEC. ID. N.º: 26)
15.	A-VI-5
16.	Glu-thr-pro NH ₂ (SEC. ID. N.º: 27)
17.	(D-ala ²)-Beta-casomorfina (1-5) (bovina)
18.	Sal Tyr-D-ala-gly-phe-D-met acetato (SEC. ID. N.º: 28)
19.	Arg-gly-asp-thr (SEC. ID. N.º: 29)
20.	N-Alfa,n-omega-di-cbz-L-arginina
21.	Sal Asp-lys acetato
22.	(+)-Alo-octopina
23.	Sodio 7-[(2-amino-2-fenilacetil)amino]-3-metil-8-oxo-5-tia-L-azabicyclo[4.2.0]oct-2-eno-2-carboxilato
24.	Val-ile-his-asn
25.	Ácido 2-amino-8-(difenilfosfinil)-octanoico
26.	Glu-His-Pro NH ₂ (SEC. ID. N.º: 30)
27.	BAPABA
28.	H-glu(lys)-OH
29.	Bis-boc-L-arg
30.	H-arg(mtr)-OH
31.	4-aminometil-L-fenilalanina boc
32.	H-met-met-OH
33.	H-trp-ile-OH
34.	Ácido N-alfa benzoil-arginina-4-amino benzoico
35.	(Thr46)-osteocalcina (45-49) (humana)

Como resultado del docking computacional, 30 compuestos de las listas del Punto 1 y del Punto 2 se examinaron experimentalmente mediante NMR. Se encontraron 11 compuestos que se unen a HLA-DR10, lo que produce un índice de acierto del 37%. Estos ligandos se recogen en la Tabla 7.

- 5 Tabla 7. Ligandos examinados mediante NMR que se descubrió que se unen al HLA-DR10. Los ligandos están separados por puntos de docking computacionalmente previstos

Punto 1:	Punto 2:
5(6) carboxitetrametilrodamina-n-succinimidil éster	Ácido N-alfa benzoil-arginina-4-amino benzoico
Metidiopropil EDTA	5-leu-encefalina (YAGFM)
Ácido desoxicólico	N alfa N omega dicarbobenzoxiarginina
Fmoc-ácido aspártico(O-bencil)-OH	Angiotensina II (DRVY)
4-dimetilaminoazobenceno-4'-sulfonil-L-valina	Bis-BOC-L-arginina
4- [5-(trifluorometil)piridin-2-il] oxi] fenil N-fenilcarbamato	

- 10 De la Tabla 7, se sintetizaron cinco ligandos de alta afinidad sintéticos (SHAL), que contenían diferentes conjuntos de ligandos del Punto 1 y del Punto 2. Se ha demostrado que tres de estas moléculas (Figura 13A), donde todas ellas contenían los pares de ligandos desoxicolato y 5-leu-encefalina, se unen al HLA-

DR10 aislado. Ninguno de estos tres SHAL se unen a albúmina o estreptavidina. Se ha determinado que el primero de los tres que se iban a someter a ensayo más extensamente, JP459B (Figura 13B), se une a HLA-DR10 con una $K_d = 23$ nM, utilizando la Resonancia de plasmones superficiales. Utilizando extractos de membrana de Raji, este SHAL competía con Lym-1 por la unión a HLA-DR10. Los estudios de unión realizados con células vivas demostraron que JP459B se unió a células de linfoma humano de Raji, pero no las células DU 145, LnCAP o 22RV normales (Figura 17E-H). Los experimentos utilizando secciones de tejido de linfoma humano congelado también demostraron la unión de JP459B a linfoma de células grandes, con gran avidéz, pero menos a las células de linfoma de células pequeñas (Figura 17A-D). Con el anticuerpo Lym-1 se obtuvieron resultados similares. Los ensayos más extensos con arrays de tejido tumoral y normal se están realizando en estos momentos.

En estudios posteriores se ha demostrado que otros ligandos se unen al HLA-DR10. Estos se muestran en la Tabla 8. Tabla 8. Otros ligandos que se unen a HLA-DR10.

Ligando ID	especie
11	3,3',5-Triyodo-dl-tironina (Previsto Punto 2) (TI)
7	2-(4-Clorofenil)-2-[6-[(4-clorofenil)sulfonil]-3-piridazinil] acetamida (12F)
9	4-Amino-2-anilino-5-benzoil-3-tiofenocarbonitrilo (5K)
8	6-Cloro-n4-(4-fenoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina (7L)
6	N-(4-[3-Cloro-5(trifluorometil)-2-piridinil] metil] fenil)-4-yodobencenocarboxamida (6J)

Por otra parte, 1,4-fenilenobis [4-(4-aminofenoxi)fenil] metanona se precipitó en la proteína diana.

15 **Ejemplo 2 Métodos computacionales para el uso en la creación de SHAL**

A. Descripción de las funciones y métodos de simulaciones moleculares

Tal y como se describe aquí, se pueden utilizar modelos moleculares para identificar inicialmente ligandos para su uso en la construcción de SHAL y/o para la optimización de SHAL. En estos momentos no existe ninguna metodología de modelos moleculares que se pueda utilizar para elaborar modelos de moléculas diana, seleccionar ligandos de unión, simular la unión de un SHAL polidentado y predecir la estructura óptima del SHAL. Sin embargo, se pueden utilizar diversos métodos de elaboración de modelos bien establecidos para facilitar estas tareas tal y como se describe aquí.

Partiendo en el nivel más alto, la predicción de moléculas diana de las estructuras terciarias (por ejemplo, marcadores de la proteína del cáncer) se realiza típicamente utilizando métodos altamente empíricos basados en la homología de la secuencia primaria con las proteínas con una estructura experimentalmente conocida. La precisión de los denominados métodos de predicción de la estructura de la proteína basada en la homología depende de la disponibilidad de estructuras de proteína homólogas y de los conocimientos del responsable individual de elaborar los modelos. Para identificar moléculas pequeñas (ligandos) que se unen específicamente a hendiduras de proteínas, se puede utilizar el "docking" computacional que se describe aquí. El docking utiliza un campo de fuerza empírico relativamente simple para describir la interacción ligando-proteína y, por tanto, se puede utilizar para seleccionar rápidamente 100 000 posibles ligandos. Para determinar conformaciones e interacciones macromoleculares preferibles, se puede utilizar la dinámica molecular clásica, que elabora modelos de las moléculas utilizando campos de fuerza empíricos de tipo bola y muelle. Por último, para la predicción precisa de estructuras e interacciones de moléculas pequeñas, se pueden resolver computacionalmente las ecuaciones de mecánica cuántica que describen los electrones y los núcleos del interior de las moléculas. Este denominado planteamiento de los primeros principios se puede utilizar para determinar las estructuras y energías de "instantáneas" estáticas de las moléculas o bien para simular los movimientos atómicos de los sistemas moleculares. El planteamiento anterior se denomina química cuántica ab initio, mientras que el planteamiento posterior se denomina dinámica molecular de primeros principios (en contraste con la dinámica molecular clásica) y constituye una simulación de la naturaleza prácticamente exacta.

B) Predicciones de la estructura proteínica basadas en la homología

El concepto básico de la predicción de la estructura proteínica basada en la homología depende de la observación de que las características estructurales de las proteínas se conservan durante la evolución en un grado tan elevado que cabe esperar que sus secuencias y por tanto las proteínas relacionadas incluso por una similitud de secuencia distante presenten estructuras en 3D similares (Chothia y Lesk (1986)

EMBO J., 5:823-826). Por tanto, una vez que se ha determinado una estructura tridimensional para al menos un

representante de una familia de proteínas, los modelos de otros miembros de la familia se pueden obtener utilizando la estructura conocida como plantilla. La elaboración de modelos de proteínas basada en homologías consiste en cuatro pasos principales: encontrar estructuras conocidas relacionadas con la secuencia de proteínas de la que se pretende elaborar un modelo, alinear la secuencia con estas estructuras, elaborar un modelo tridimensional y valorar el modelo (Marti-Renom *et al.* (2000) *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 29: 291-325).

La predicción de la estructura proteínica basada en la homología (también denominada elaboración de modelos comparativos) produce un modelo de todos los átomos de una secuencia basada en su alineación con una o más estructuras de proteínas relacionadas. La elaboración del propio modelo tridimensional incluye la elaboración de modelos secuenciales o simultáneos del núcleo de la proteína, las hélices y las cadenas laterales.

La Figura 15 ilustra un diagrama de flujo que describe los principales pasos de la elaboración de modelos de proteínas basados en homologías.

La precisión de un modelo, elaborado utilizando la técnica de elaboración de modelos comparativos, normalmente está relacionada con el porcentaje de identidad de la secuencia con la estructura en la que se basa. Los modelos comparativos de alta precisión se basan en más de un 50% de identidad de la secuencia con sus plantillas. Tienden a tener aproximadamente una media cuadrática (RMS) de 1Å de error para los principales átomos de la cadena. Esta precisión es comparable con la de la estructura por resonancia magnética nuclear (NMR) de resolución media o la estructura por rayos X de baja resolución. Los errores en estos casos se limitan habitualmente a errores en la asignación de rotámeros de la cadena lateral, pequeños cambios o distorsiones en las regiones centrales de la cadena principal y ocasionalmente errores más importantes en las hélices.

Un planteamiento general de elaboración de modelos será similar al que se utilizaba con éxito con anterioridad para elaborar modelos de proteínas diana de alta y baja homología (Venclovas *et al.* (1999) *Proteins-Structure Function and Genetics*, 73-80). Dado que nuestros objetos de elaboración de modelos (por ejemplo, marcadores cancerígenos como HLA-DR10) pueden tener una elevada homología de secuencia (identidad de secuencia >50%), podemos confiar en la comparación de pares de secuencias de modelos de dianas (consulta) con las proteínas de estructuras conocidas (del Protein Data Bank (PDB)) para identificar las plantillas estructurales más próximas. Para ello, se puede utilizar un algoritmo de comparación sensible de pares de secuencias de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) *J. Mol. Biol.*, 147:195-197) implementado en el programa SSEARCH (Pearson (1991) *Genomics* 11:635-650). A un nivel elevado de homología de la secuencia, la alineación de la estructura para las regiones estructurales conservadas se puede utilizar directamente en la elaboración de modelos.

Cuando hay un número de plantillas estructurales de similitud comparable disponible se puede utilizar MODELLER, un programa de elaboración de modelos comparativos capaz de combinar automáticamente una serie de estructuras de plantilla para representar mejor la estructura de la consulta. Cuando hay regiones críticas presentes en la molécula diana, se puede tener especial cuidado al asignar conformaciones a estas regiones. Las conformaciones candidatas para estas regiones se pueden producir realizando una búsqueda en una base de datos de estructuras homólogas de los fragmentos de longitud idéntica que también satisfacen las limitaciones estéricas de estas regiones. Tanto la similitud de la secuencia como el contexto estructural cercano a la región se pueden tener en cuenta para seleccionar la conformación real. Las cadenas laterales del modelo se pueden posicionar utilizando una biblioteca de rotámeros dependientes del eje central (Bower *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.* 267:1268-1282).

La evaluación de los modelos obtenidos se puede realizar utilizando diversas técnicas. Una de estas, Prosall (Sippl (1993) *Proteins*, 17:355-362.; Aloy *et al.* (2000) *J Comput*

Aided Mol Des. 14:83-92), que se utiliza para detectar errores en estructuras proteínicas, crea un perfil de energía a lo largo de la secuencia de la proteína. Las regiones que tienen asignados valores de energía elevados por Prosall normalmente sirven de buenos indicadores de errores en la representación de la estructura de estas regiones concretas. Para las comprobaciones detalladas de modelos de estructuras, se puede utilizar el módulo de verificación de estructuras del programa WHATIF (Vriend (1990) *J. Mol. Graph* 8: 52-56)

junto con la inspección visual. Si estas evaluaciones de calidad del modelo identifican algún problema en el modelo de la estructura, se repetirán los pasos apropiados (como la asignación de la hélice o el posicionamiento de la cadena lateral) de manera iterativa hasta obtener un modelo tridimensional de calidad aceptable.

Utilizando estos métodos se desarrolló un modelo informático de la estructura molecular de la subunidad beta del HLA-DR10 que contiene la región que se ha demostrado que resulta crítica para la unión del anticuerpo Lym-1 a las células B malignas y la estructura se comparó con la estructura de otras moléculas de HLA-DR (véase el Ejemplo 1 *supra.*). Este modelo se utilizó para desarrollar SHAL específicos del

HLA-DR10 como los descritos aquí.

C) Docking computacional

Se han utilizado métodos computacionales como el docking para acelerar el proceso de descubrimiento de fármacos y diseño de inhibidores seleccionando grandes cantidades de moléculas y prediciendo si se unen o no a los puntos activos de proteínas diana (Desjarlais *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87:6644-6648; Mao *et al.* (1998) *Bioorganic and Medicinal Chem. Letts.*, 8:2213-2218; Olson y Goodsell (1998) *Environmental Res.*, 8:273-285; Rutenber *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.*, 268:15343-15346). Estos esfuerzos han logrado un éxito moderado en el diseño de nuevos fármacos efectivos contra proteínas del VIH críticas para la infección y transmisión de la enfermedad.

En determinadas realizaciones, este planteamiento es generalmente útil como primer paso en la identificación de ligandos (fracciones de unión) que se unen habitualmente a la molécula o moléculas diana del rango micromolar. Los protocolos detallados para los métodos de docking utilizando SPHGEN y DOCK han sido descritos en la bibliografía. Por ejemplo, estos métodos se han utilizado para identificar ligandos que se unen a puntos específicos del dominio diana de la neurotoxina del tétanos (Cosman *et al.* (2002) *Chem Res Toxicol* 15:1218-1228; Lightstone *et al.* (2000) *Chem.*

Res. Toxicol., 13:356-362).

Se utilizó el programa DOCK 4.0 para realizar una selección en el Available Chemical Directory de moléculas pequeñas (unas 300 000), a fin de identificar las 2500 principales moléculas que se prevé que se unen al Punto 1 y Punto 2 identificados (Figura 12).

El docking computacional se puede entender como un proceso de tres pasos: 1) identificación del punto de la superficie de la proteína; 2) docking de ligandos en el punto de unión identificado; y 3) puntuación y clasificación de los ligandos (Halperin *et al.* (2002) *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 47:409-443). Para la identificación del punto, generalmente se calcula la superficie accesible solvente de la proteína diana. Utilizando el programa SPHGEN, una herramienta en DOCK (Moustakas y Kuntz (2002). DOCK5.0 (San Francisco, UCSF)), se identificaron hendiduras cóncavas en la superficie de la proteína, llenando las hendiduras con esferas de diferente tamaño de radio. Básicamente, de este modo se calcula el volumen de la hendidura. La superficie de la proteína puede tener entre treinta y cientos de hendiduras en base al tamaño y forma de la proteína. Una vez identificadas estas hendiduras, la inspección visual de las hendiduras identificó el punto de unión en base al tamaño de la hendidura y la evidencia experimental disponible, como los aminoácidos conocidos implicados en la unión o catálisis. La hendidura de unión seleccionada se utilizó posteriormente en el procedimiento de docking siguiente.

Los estudios de docking identifican moléculas pequeñas que se podrían unir específicamente al punto de unión seleccionado en la proteína. El programa DOCK 5.0 examina una base de datos de compuestos en el ordenador y predice qué moléculas es probable que se unan con fuerza al punto de unión. Este procedimiento se ilustra en la Figura 16. Utilizamos el Available Chemicals Directory (ACD) de MDL como nuestra base de datos de compuestos a seleccionar.

La base de datos se preparó realizando una selección previa para eliminar los jabones y tintes. Después de calcular las cargas parciales para los compuestos utilizando cargas de Gasteiger-Marsili (Gasteiger y Marsili (1978) *Tetrahedron Letts.*, 34: 3181-3184; Gasteiger y Marsili (1980) *Tetrahedron* 36: 3219-3288; Gasteiger y Marsili (1981) *Organic Magnetic Resonance* 15:353-360) en Sybyl, la base de datos se dividió por carga total del compuesto, y los compuestos con una carga formal $>\pm 3$ se descartaron. Por otra parte, los compuestos con menos de 10 y más de 80 átomos pesados (no hidrógenos) se descartaron para centrarse en los compuestos dentro del rango de tamaño para los principales compuestos de fármacos (preliminar). Esta selección previa dotó de una mayor eficiencia a la base de datos y eliminó cálculos innecesarios con los compuestos que se sabe que nunca se unen o que se unen de manera indiscriminada. Para simular una técnica de docking flexible, se generaron 20 conformaciones únicas para cada compuesto de la base de datos. Cada una de estas conformaciones se sometió a docking rígido en el punto de unión. Se examinaron diferentes orientaciones dentro del punto de unión para cada una de las conformaciones de cada uno de los ligandos. Todos los compuestos fueron puntuados por minimización de energía, donde las condiciones electrostáticas y de van der Waals intermoleculares se obtienen de AMBER (Weiner (1984) *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 765-784). A pesar de que las moléculas se clasifican en base a las puntuaciones, la función de puntuación no predice las afinidades de unión.

A continuación se inspeccionaron visualmente las 2500 principales moléculas para seleccionar en orden descendente hasta 35 moléculas para ensayos de unión en experimentos tal y como se describe en el Ejemplo 1. Los ligandos

se seleccionaron y los SHAL bidentados se construyeron y sometieron a ensayo tal y como se describe en el Ejemplo 1.

La unión de los principales compuestos en la diana se puede mejorar en varios niveles de magnitud utilizando múltiples compuestos (2-3) unidos. Para que el inhibidor sea efectivo, tiene que reconocer específicamente la proteína diana y unirse con una afinidad elevada.

D) Cálculos de química cuántica

Se han desarrollado diversos métodos de simulación química, que abarcan desde modelos de mecánica molecular empíricos tipo bola y muelle hasta métodos de química cuántica *ab initio* (primeros principios) que calculan soluciones aproximadas para las ecuaciones de mecánica cuántica exactas que describen los electrones y los núcleos. Típicamente, la selección de métodos implica concesiones entre la precisión, el tamaño del sistema químico y el coste computacional. Estos métodos de elaboración de modelos se pueden dividir en términos generales en métodos de dinámica molecular que simulan la evolución temporal de procesos químicos y métodos estáticos que predicen propiedades moleculares independientes del tiempo, tales como la configuración de energía mínima de una molécula o la energía de una reacción química. Se pueden utilizar los tres métodos de elaboración de modelos moleculares que se describen a continuación: química cuántica *ab initio*, dinámica molecular clásica y dinámica molecular de primeros principios para el diseño y la optimización de los SHAL que se describen aquí.

1. Química cuántica *ab initio* (OM)

La química cuántica *ab initio* implica la computación de soluciones aproximadas para la ecuación de Schroedinger no relativista exacta que describe un sistema molecular (Jensen (1999) *Introduction to Computational Chemistry*, New York, John Wiley y Sons). En principio estos métodos pueden predecir las propiedades de cualquier sistema químico conforme a una precisión arbitraria, aunque en la práctica el coste computacional limita la precisión de estos métodos y el tamaño de los sistemas moleculares a los que se pueden aplicar. Sin embargo, los cálculos de química cuántica *ab initio* se aplican rutinariamente para calcular estructuras precisas y energías de reacción para sistemas moleculares que incluyen hasta cientos de átomos.

Existe una jerarquía de diferentes métodos de química cuántica *ab initio* que implican descripciones matemáticas cada vez más precisas de la función de onda electrónica —la descripción matemática de la distribución de los electrones alrededor de los núcleos de una molécula (*Id.*). La aplicación de química cuántica típicamente requiere la selección tanto de la descripción de las interacciones electrón-electrón (nivel de teoría) como de la flexibilidad espacial de los electrones (conjunto de base). Se ha desarrollado una clase relativamente nueva de métodos denominados Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) que incluye parametrizaciones empíricas de las interacciones electrón-electrón, y a menudo proporciona una precisión comparable a los métodos de química cuántica de alto nivel anteriores (tales como los métodos de Clúster Acoplado), pero con un coste computacional mucho menor. Los métodos DFT normalmente se denotan por el "funcional" electrón-electrón empírico empleado. Dos funcionales DFT ampliamente utilizados son el funcional de intercambio híbrido de tres parámetros de Becke (Becke (1993) *J. Chem. Phys.* 98: 5648-5652) y el funcional de correlación de electrones por gradiente corregido de Lee-Yang-Parr (Lee *et al.* (1988) *Chemical Physics* 123: 1-25). Se ha demostrado ampliamente que estos producen estructuras químicas precisas y energías de reacción para la mayoría de las moléculas cuando se utilizan con conjuntos de bases suficientes (Jensen (1999) *Introduction to Computational Chemistry*, Nueva York, John Wiley y Sons).

Las simulaciones de química cuántica descritas en el presente se utilizan para estudiar procesos químicos que ocurren en el entorno extracelular inmediato. Los métodos de química cuántica anteriormente descritos típicamente describen únicamente una molécula aislada (normalmente descrita como "fase gas" y, por tanto, no incluyen el entorno químico, como moléculas solventes y contraiones, que con frecuencia es crítico para la estructura y la energía de las moléculas biológicas. La inclusión explícita de las moléculas de agua y los contraiones del entorno por lo general no resulta computacionalmente factible; sin embargo, se han desarrollado varios métodos dentro del enfoque de la química cuántica para incluir efectivamente los efectos de las interacciones de los solventes. Típicamente estos métodos utilizan un modelo de solvente como un medio continuo que se polariza en respuesta a las cargas derivadas de la química cuántica. A pesar de que hay muchas situaciones donde la inclusión explícita del solvente es necesaria, los denominados modelos del continuum polarizable han resultado razonablemente precisos para predecir las propiedades químicas en fase solvente, incluyendo las energías de disolución totales y las constantes ácidas (Schuurmann *et al.* (1998) *J. Physical Chemistry A* 102: 6706-6712; Tran y Colvin (2000) *J. Molecular Structure, Theochem* 532: 127-137).

El método dipolo de Langevin de Warshel está relacionado con estos modelos de continuum polarizables, pero incluye una representación más realista del solvente polar. El método dipolo de Langevin modela el solvente como un amplio conjunto de dipolos polarizables en una cuadrícula tridimensional fija (Luzhkov y Warshel (1992) *J. Computational Chemistry* 13:199-213). Este enfoque ha sido recientemente parametrizado para su uso con cargas de soluto obtenidas *ab initio* y se ha demostrado que produce energías de disolución para moléculas neutras e iónicas comparables o mejores que los métodos PCM anteriormente descritos (Florian y Warshel (1997a) *J Am Chem Soc.*, 119:5473-5474).

2. Dinámica molecular de primeros principios (IPMD)

Al combinar las fuerzas determinadas directamente por un método QM para impulsar el movimiento clásico de todos los átomos en una simulación, se puede conseguir la precisión de la mecánica cuántica (QM) con las ventajas de la dinámica molecular clásica. Este enfoque resultó computacionalmente viable con el desarrollo de una nueva técnica basada en la teoría del funcional de la densidad (DFT) (Kohn Sham (1965) *Physical Review* 140:A1133) que trata los grados electrónicos de libertad al mismo tiempo que las ecuaciones nucleares del movimiento (Car y Parrinello (1985) *Physical Review Letters* 55:2471-2474; Galli y Parrinello (1991) Pp.283-304 en: *Computer Simulation in Materials Science*, Países Bajos, Kluwer Academic Publishers). Dado que el método emplea la teoría QM para describir todo el sistema, a menudo se refiere como dinámica molecular de primeros principios (FPMD). En la aplicación típica de la FPMD, solo los electrones de valencia químicamente activa se describen de forma explícita con una expansión en una base de onda plana, mientras que los electrones de núcleo químicamente inerte son representados por pseudopotenciales (Galli y Pasquarello (1993) Pp.261-313 en: *Computer Simulation in Chemical Physics*, D. J. Tildesley, ed. Dordrecht, Kluwer; Yin y Cohen (1982) *Physical Review B (Condensed Matter)* 25:7403-7412). Dado que los pseudopotenciales son transferibles por diseño, este método no requiere reparametrización cuando se estudian nuevos sistemas. Además, el uso de un conjunto de base de onda plana se presta naturalmente a la aplicación de condiciones limítrofes periódicas, por lo que el método resulta adecuado para sistemas de modelado en la fase condensada. Este método, combinado con varias otras mejoras computacionales (Gygi (1993) *Physical Review B* 48:11692-11700; Hutter *et al.* (1994) *Computational Materials Science* 2:244-248; Payne *et al.* (1992) *Rev. Modern Physics* 64: 1045-1097), ha resultado fundamental para resolver el problema de integrar la QM y la MD.

Las primeras aplicaciones de simulaciones de FPMD se limitaban a pequeños sistemas como el silicio (Car y Parrinello (1985) *Physical Review Letters* 55:2471-2474; Stich *et al.* (1989) *Physical Review Letters* 63:2240-2243). Dado que estos métodos han mejorado constantemente desde entonces y existen recursos computacionales avanzados disponibles (como los superordenadores de escala Teraflop DOE), ahora resulta posible investigar pequeños sistemas bioquímicos que contienen varios cientos de átomos durante marcos temporales de picosegundos (Carloni y Alber (1998) *Perspectives in Drug Discovery and Design* 9/11:169-179; Pantano *et al.* (2000) *J. Molecular Structure (Theochem)* 530:177-181; Rovia y Parrinello (2000) *International Journal of Quantum Chemistry* 80:1172-1180). Por ejemplo, recientemente hemos simulado la dinámica conformacional de un pequeño modelo químico de la cadena de ADN en solución. A medida que aumenta el número de sistemas que se han investigado con este nuevo enfoque, cada vez es más evidente que el aumento del gasto computacional se ve compensado en forma de propiedades estructurales y dinámicas extremadamente precisas. En particular, estos métodos permiten potencialmente simulaciones dinámicas muy precisas de fenómenos químicos, incluyendo las interacciones quelante-ión de metal y las reacciones catalizadas por enzimas.

E) Dinámica molecular clásica (MD)

La dinámica molecular clásica se puede utilizar para identificar la orientación exacta de los ligandos en los puntos de unión de la molécula o moléculas diana (por ejemplo, los puntos de unión de HLA-DR10 (Punto 1 y Punto2)). Esta información se puede utilizar para diseñar los ligandos multivalentes para transportar radioisótopos selectivamente hasta la molécula diana y/o hasta las células que presentan la molécula diana.

En concreto, estos datos estructurales ayudan a identificar qué grupos funcionales del ligando(s) se pueden utilizar para unir sintéticamente el enlazador. Para todos los ligandos que están experimentalmente verificados que se unen a la diana, la dinámica molecular clásica se puede aplicar sobre el ligando en los puntos de unión a la diana para determinar la conformación y orientación del ligando y las interacciones específicas que median en la especificidad de unión (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y de Van der Waals). En determinadas realizaciones, las simulaciones de dinámica molecular incluirán la diana y los ligandos solvatados en una caja de agua periódica. Para cada ligando, se pueden realizar simulaciones de 500 ps a varios nanosegundos utilizando múltiples orientaciones de partida.

Un componente importante de los SHAL polidentados de esta invención es el enlazador molecular entre los ligandos individuales (fracciones de unión) que comprenden el SHAL. Típicamente este enlazador adopta una conformación de fase acuosa (o conjunto de conformaciones) que contiene los dos (o más) ligandos a distancias apropiadas para unirse eficientemente a su punto de unión en la superficie de la diana. Para ayudar a diseñar este enlazador, se puede aplicar la dinámica molecular clásica sobre la molécula enlazadora solamente y sobre el enlazador unido a compuestos del ligando específicos.

Se puede utilizar el programa CHARMM para realizar simulaciones de dinámica molecular clásica sobre diversos enlazadores. Por ejemplo, las simulaciones realizadas con enlazadores PEG pueden utilizar un número diferente de unidades PEG (4, 6 y 8) en las moléculas. Las estructuras de partida para las cuatro simulaciones pueden tener las moléculas en una conformación plenamente extendida. Estas moléculas extendidas se pueden solvatar en cajas de agua y añadir iones de sodio a cada caja para neutralizar los sistemas. Estos sistemas solvatados se calentaron, por ejemplo, a 300 K y se dejaron equilibrar durante

200 picosegundos. Típicamente las simulaciones se pueden realizar a una temperatura constante (ensamble NVT) y las interacciones electrostáticas se pueden tratar añadiendo malla de partícula Ewald (PME).

5 Inicialmente los dos compuestos que se van a unir se pueden examinar visuales a la proteína determinado por docking y dinámica molecular utilizando gráficos informáticos. Por ejemplo, se puede producir un enlazador de polietilenglicol (PEG) utilizando software de diseño molecular (AMPAC) entre los dos compuestos. Esta estructura se puede simular después utilizando dinámica molecular clásica en una caja de agua periódica, por ejemplo como se ha descrito antes durante varios nanosegundos. Se pueden analizar los datos resultantes sobre los movimientos dinámicos para medir la distancia media ligando-
10 ligando y la orientación relativa del ligando. Estos datos se pueden comparar con la distancia entre los ligandos y la orientación relativa en la superficie de la diana para determinar la longitud óptima para el enlazador.

15 Las simulaciones de dinámica molecular también se pueden utilizar para investigar algunas otras propiedades en el conjunto de los SHAL a fin de optimizar su efectividad terapéutica. En concreto, se pueden utilizar simulaciones de dinámica molecular para investigar algunas modificaciones entre las que se incluyen la estructura química del propio enlazador y los dos ligandos de cada extremo. El objetivo de estas simulaciones consistirá en identificar los probables efectos de estas modificaciones sobre la eficiencia de unión a la diana y la especificidad antes de realizar modificaciones sintéticas caras.

20 Los métodos de dinámica molecular utilizan un campo de fuerza clásico obtenido empíricamente para simular el movimiento de cada átomo en un sistema químico. Esta metodología está altamente desarrollada para la simulación de ácidos nucleicos, (Beveridge y McConnell (2000) *Curr. Opinion in Structural Biology* 10:182-196) y proteínas (Brooks *et al.* (1983) *J. Computational Chemistry* 4:187-217; Cheatham y Brooks (1998) *Theoretical Chemistry Accounts* 99:279-288; Doniach y Eastman (1999) *Curr. Opinion in Structural Biology* 9: 157-163). Las simulaciones de dinámica molecular típicas publicadas implican 10-100 000 átomos (incluyendo tanto las biomoléculas que se van a simular como una pantalla
25 de agua que las rodea y contraiones) que son simulados durante varios nanosegundos de tiempo. La simulación más grande publicada es una simulación de un microsegundo de una proteína pequeña (Duan y Kollman (1998) *Science* 282:740-744). Sin embargo, la escala temporal de varios nanosegundos resulta suficiente para capturar la relajación estructural y la reorganización del solvente, y es lo suficientemente
30 larga en algunos casos para simular transiciones entre diferentes conformaciones macromoleculares (Cheatham y Kollman (1996) *J. Mol. Biol.*, 259:434-444; Yang y Pettitt (1996) *J. Physical Chemistry A* 100:2564-2566).

Recientemente se ha publicado una simulación de dinámica molecular de polietilenglicol (PEG) que resulta relevante para el diseño de enlazadores PEG para los SHAL. Heymann y

35 Grubmuller utilizaron la dinámica molecular clásica para describir las propiedades conformacionales y elásticas de cadenas de PEG individuales (Heymann y Grubmuller (1999) *Chemical Physics Letters* 307: 425-432; Young y Lovell (1992) *Introduction to Polymeres*, Nueva York, Chapman y Hall). Simularon un PEG de 18-mer (aprox. 1 kDalton de peso molecular) en la fase acuosa (solvatado con 1539 moléculas de agua) y en la fase gas (para aproximar la solvación en un solvente no polar como hexadecano).
40 Averiguaron que en la fase gas el PEG se colapsaba rápidamente para formar una estructura compacta sin estructura local, medida por el grado para el cual el PEG tenía una estructura local helicoidal. En agua, el PEG se comporta de forma muy diferente. Muestra una reducción del radio de giro en comparación con la estructura plenamente extendida, pero conserva un marcado grado de helicidad y por tanto cierto grado de rigidez. Estas simulaciones indican que la rigidez local de la estructura de PEG está causada por las
45 moléculas de agua que forman los puentes por enlaces de hidrógeno entre sucesivos oxígenos de la cadena de PEG. También simularon el alargamiento de la cadena de PEG con un rango de fuerzas de entre 0 y 500 piconewtons (esto imita estudios experimentales con Microscopios de fuerza atómica). Descubrieron un alto consenso en su fuerza prevista frente a las curvas de extensión con los valores recientemente medidos en una única molécula de PEG (Oesterhelt *et al.* (1999) *New Journal of Physics* 1:6.1-6.11).
50

Estos resultados demuestran que las simulaciones de dinámica molecular clásica de PEG pueden reproducir de forma precisa propiedades complejas como curvas de fuerza/extensión y confirma con solidez la precisión de las simulaciones de soportes PEGilados propuestas. A pesar de que el soporte PEGilado actualmente en uso (13,6 kDalton de peso molecular) es considerablemente mayor que el PEG
55 18-mer simulado por Heymann y Grubmuller, se encuentra perfectamente dentro del alcance de las simulaciones de dinámica molecular rutinarias.

Las simulaciones de dinámica molecular se pueden realizar fácilmente con el paquete de software CHARMM (Brooks *et al.* (1983) *J. Computational Chemistry* 4:187-217) utilizando la serie de parámetros de la versión 22 (MacKerell *et al.* (1998). *J. Physical Chemistry B* 102:3586-3616). El análisis se puede
60 realizar utilizando las herramientas de análisis distribuidas con CHARMM y VMD, una herramienta gráfica para el análisis de la dinámica molecular (Humphrey *et al.* (1996) *J. Molecular Graphics* 14: 33-38).

Los pasos de una configuración típica y del proceso de simulación son los siguientes:

A. Configuración preliminar.

1. Cálculo de cargas parciales para los tipos de átomos no incluidos en el campo de fuerza de CHARMM. Los modelos de compuestos que contienen los tipos de átomos no parametrizados se optimizarán a nivel de la teoría de Hartree-Fock utilizando un conjunto de base de 6-31G(d). Tras la convergencia, las cargas parciales de cada átomo se computarán utilizando el método de ajuste de cargas de Merz-Kollman (Besler *et al.* (1990) *J. Computational Chemistry* 11:431-439). Estas cargas pueden sustituir a las cargas atómicas por defecto.

2. Moléculas a simular:

a. Construcción de estructuras moleculares

Las moléculas a simular se pueden producir utilizando QUANTA y las cargas atómicas se obtendrán como en el paso uno anterior. A continuación, se puede computar la carga neta del conjunto del compuesto.

b. Solvatación de estructuras moleculares:

Las moléculas y los complejos de moléculas contruidos en el paso 2a anterior se pueden

neutralizar utilizando iones Na^+ que se posicionan utilizando el programa SOLVATE. A continuación se puede solvatar todo el sistema en las moléculas de una caja de agua y esta caja de simulación se puede ajustar posteriormente para producir la densidad adecuada.

B. Realización de la simulación:

1. Equilibrado del sistema de molécula/agua/contraión:

a. Minimización: Para eliminar la tensión residual que queda en las estructuras moleculares después de la fase de construcción, las moléculas solvatadas del paso 2b anterior pueden ser minimizadas durante 10 000 pasos, de los que las 1 000 primeras iteraciones se realizan utilizando el descendiente más profundo y el resto utilizando los métodos de Newton-Raphson adoptados.

b. Equilibrado: Tras la minimización, la temperatura se puede aumentar de 0K a 300K durante 10 ps y posteriormente mantenerse fija a 300K. El sistema se puede equilibrar durante 200 ps a temperatura constante. Las fuerzas de rango largo se manipulan por el método de malla de partícula de Ewald (Essmann *et al.* (1995) *J. Chemical Physics* 103: 8577-8593).

Las moléculas de agua son TIP3P (Jorgensen *et al.* (1983) *J. Chemical Physics* 79: 926-935). Se puede utilizar un paso de tiempo de integración de 2 femtosegundos, y se puede utilizar el algoritmo SHAKE para limitar todos los movimientos de los átomos de hidrógeno (Reichert y Welch (2001) *Coordination Chemistry Reviews* 212: 111-131).

c. Pasos de producción: Para las simulaciones de producción, se puede utilizar la dinámica molecular de temperatura constante (empleando el ensamble NVT). Se puede utilizar el método de malla de partícula de Ewald (Essmann *et al.* (1995) *J. Chemical Physics* 103:8577-8593) para las fuerzas de rango largo. Durante la aplicación de la dinámica, la serie completa de coordenadas atómicas se puede guardar cada 0,1 ps para su posterior análisis. Para las simulaciones preliminares, las simulaciones de dinámica molecular se realizaron en nuestros ordenadores Compac Alpha a una velocidad correspondiente a unas 625 cpu horas (unas 4 semanas) por nanosegundo; por tanto, las simulaciones de varios nanosegundos de estos sistemas resultarán rutinariamente viables en nuestra gran red de estaciones de trabajo.

Ejemplo 3 Síntesis y ensayo de un SHAL bidentado

El SHAL bivalente (LeacPLD)₂LPDo fue sintetizado, purificado por HPLC y caracterizado por espectrometría de masas. Este SHAL tenía dos ligandos bidentados JP459B interconectados a través de un enlazador y un DOTA unido en el tercer brazo (véase, por ejemplo, la Figura 14).

Los SHAL se diseñaron en torno a un residuo de lisina protegido ortogonalmente para facilitar la síntesis de la resina en fase sólida. Se utilizó un mini-PEG similar a un ácido amino protegido por Fmoc (2 CH₂O's) como enlazador para aumentar incrementalmente la distancia entre las fracciones de encefalina y desoxicolato. Se utilizó Fmoc-biotinil-lisina para introducir biotina en los SHAL para los experimentos con Biacore. Todos los SHAL tienen la misma configuración: CO₂H:Biotina-lisina:lisina:(lisina a NH₂: 0, 1, 2 enlazador mini-PEG, desoxicolato)(lisina g NH₂: LFGGY-NHAc). El SHAL bidentado sigue la convención: CO₂H:Biotina-lisina:lisina:[(lisina a NH₂: 0, 1, 2 enlazador mini-PEG, desoxicolato)(lisina NH₂: LFGGY-NHAc)]₂ - y, por tanto, es asimétrico cerca del segundo residuo de lisina.

Todas sustancias químicas utilizadas se adquirieron a Aldrich o Nova Biochem. Los SHAL se sintetizaron utilizando síntesis Fmoc de fase sólida estándar de resina de clorotritilcloruro.

Los ligandos se clivaron de la resina y los grupos de protección se eliminaron utilizando los reactivos apropiados. Los ésteres de ácido trifluoroacético formados en los alcoholes primarios de desoxicolato

durante el clivaje de la resina se eliminaron mediante agitación en bicarbonato de amonio. Los SHAL se purificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC). La HPLC analítica se realizó a 1 mL / min en una máquina Agilent 1100 (Waters Symmetry C18, columna de 5 mm, 4,2 x 150 mm) y la HPLC de preparación se realizó a 10 mL / min en una máquina de preparación Waters (Waters Symmetryprep C18, columna de 7 mm, 19 x 300 mm). Los SHAL se caracterizaron usando espectroscopia por resonancia magnética nuclear (NMR) y espectrometría de masas por electrospray. Los espectros ¹H y ¹³C de la NMR se registraron en un espectrómetro Bruker DRX 500 MHz. Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro Micromass Quattro Micro API operando en modo ion positivo.

La espectrometría de masas del (LeacPLD)²LPDo demostró que no contiene ningún DOTA libre. No cabría esperar la presencia de DOTA libre basándose en el proceso usado para sintetizar el SHAL. Se sintetizó (LeacPLD)²LPDo uniendo cada componente enlazador o ligando a una cadena creciente covalentemente enlazada a la superficie de una resina. Después de cada reacción química la resina se lavó abundantemente para eliminar los productos que no habían reaccionado. El DOTA se unió al enlazador al comienzo de la síntesis. Una vez que se lavó el exceso de DOTA, se realizaron múltiples reacciones químicas adicionales sobre la resina para añadir los diversos enlazadores y ligandos, y tras cada reacción se lavaron de nuevo los productos que no habían reaccionado. Para el momento en el que la síntesis del SHAL se había completado, la cantidad de DOTA libre presente en la muestra era indetectable por examen con HPLC y espectroscopia de masas. El enlace de DOTA es extremadamente estable, por lo que una vez que se ha unido no se desprende del SHAL.

Durante la radioquímica, entre los componentes que pueden estar presentes en el pico de desprendimiento temprano que pueden tener asociada una etiqueta radioisotópica se incluyen el tampón salino (bicarbonato de amonio), posiblemente trazas de trifluoroacetato eliminado de la hidrólisis del SHAL durante el paso final de la síntesis, y el exceso de EDTA y del isótopo libre o del complejo isótopo-EDTA que no se unió al DOTA. Puede ser simplemente la diálisis no sea el método preferible para eliminar eficientemente todo este material. La diálisis inversa es un método preferible para la purificación. Alternativamente, el lavado del quelato (EDTA) tras la radioquímica se puede realizar utilizando una columna de perlas de EDTA para eliminar los radiometales que no han sido quelados por el DOTA o que mantienen una unión débil de una manera no específica.

Para que el metal acceda al DOTA de forma eficiente, también es importante ajustar la mezcla de reacción a un pH alcalino adecuado. Dado que el SHAL como molécula es bastante diferente de una molécula anticuerpo-DOTA, el método utilizado para aumentar el pH del complejo SHAL-DOTA preferiblemente también aumenta el pH lo suficiente en el SHAL. Se puede conseguir fácilmente el acceso de otros metales al DOTA si están presentes en alguna fase. Estos se pueden detectar comprobando el espectro de masas del compuesto. Hemos analizado el espectro de los SHAL purificados y observamos escasos metales o ninguno.

Los SHAL de desoxicolato-yodotironina biotinilados se sintetizan de manera análoga.

Los ensayos ELISA demostraron que el SHAL, LeacPLBD (el SHAL bidentado univalente), se une a las células que contienen HLA-DR10 y discrimina entre las que contienen y las que no contienen HLA-DR10 (véase la Figura 20).

Se realizaron diversos estudios farmacocinéticos, de biodistribución y captura de imágenes con resultados coherentes. En determinadas realizaciones, la biodistribución de ¹¹¹In-DOTA [SHAL 070804(LeacPLD)²LPDo] se determinó en ratones con tumores Raji (véase, por ejemplo, la Figura 19A).

Ejemplo 4

Desarrollo de ligandos sintéticos de alta afinidad que se unen a un epítipo estructural del receptor de células tumorales HLA-DR10

Se han identificado diversos receptores de proteína de la superficie celular que distinguen entre las células malignas del cáncer y sus homólogas normales. A pesar de que se ha demostrado que algunos de estos receptores son más abundantes en las células del cáncer (por ejemplo, CD20, CD22), se ha confirmado que otros difieren estructuralmente (por ejemplo, HLA-DR10, Muc-1) de los mismos receptores u otros estrechamente relacionados en las células normales. Esto ha permitido desarrollar diversos reactivos de receptor específico basados en anticuerpos, conjugados con radioisótopos para su uso en radioinmunoterapia. Lym-1, un anticuerpo desarrollado para unirse a un epítipo estructural único de un receptor de superficie celular abundante, HLA-DR10, que se encuentra únicamente en el linfoma humano y en los linfocitos de células B normales, se ha utilizado con bastante éxito para el tratamiento del linfoma no Hodgkin. En un esfuerzo por desarrollar productos terapéuticos más pequeños y efectivos para el tratamiento del linfoma no Hodgkin, hemos sintetizado el primero de una serie de ligandos de alta afinidad selectivos (SHAL) de pequeño tamaño (<3kD) que se unen a este mismo epítipo estructural del HLA-DR10. Se creó un modelo de homología para HLA-DR10 utilizando cuatro estructuras de cristales conocidas de moléculas HLA-DR relacionadas. Se identificaron dos "hendiduras" únicas ubicadas en la superficie de la proteína adyacente a aminoácidos clave necesarios para la unión de Lym-1 y se utilizaron técnicas de docking computacional para realizar una preselección en una amplia biblioteca de moléculas

pequeñas, a fin de predecir qué compuestos se deberían unir a cada punto. Un reducido número de estos compuestos se sometieron a ensayo experimentalmente utilizando espectroscopia NMR para confirmar su unión a la proteína del HLA-DR10 aislado, y se unieron pares de compuestos que se unen a las dos "hendiduras" diferentes utilizando química sintética de fase sólida para crear una serie de reactivos bidentados con enlazadores de diferente longitud. Se ha demostrado que los SHAL que presentan la afinidad más elevada al HLA-DR10 aislado (aprox. 23 nM) se unen selectivamente a nueve líneas de células cultivadas diferentes que contienen HLA-DR10 y a secciones de tejido congeladas y fijadas obtenidas de pacientes con linfomas humanos de células pequeñas y células grandes. También se sintetizó una forma bivalente de este SHAL y se demostró que mejora la unión celular.

10 **Ejemplo 5**

Absorción mejorada por hexa-arginina y residualización de ligandos de alta afinidad selectivos por células del linfoma Raji

15 Diversas secuencias peptídicas ricas en arginina similares a las que se encuentran en las proteínas virales se han conjugado con otras moléculas para facilitar su transporte al citoplasma y al núcleo de las células diana. El ligando de alta afinidad selectivo (SHAL) (DvLPBaPPP)₂LLDo, que se desarrolló para unirse únicamente a las células que expresan HLA-DR10, se ha conjugado con uno de estos dominios de transducción peptídica, hexa-arginina, para valorar el impacto del péptido sobre la absorción de SHAL y la internalización en las células Raji, un linfoma de células B.

20 Se creó un análogo del SHAL (DvLPBaPPP)₂LLDo que contiene un péptido de

hexa-arginina añadiendo seis residuos de D-arginina secuencialmente a una lisina insertada en el enlazador del SHAL. Se examinó la unión del SHAL, la internalización y la residualización en células Raji que expresan HLA-DR10 utilizando ensayos de unión de células completas y microscopía confocal. Se observó que las células Raji se unen dos veces más al análogo del SHAL de hexa-arginina etiquetado con ¹¹¹In que las células Raji tratadas con el SHAL relacionado. El SHAL de hexa-arginina mantenía el triple de asociación con las células Raji tras el lavado, lo que sugiere que el péptido también mejoró la residualización del ¹¹¹In transportado a las células. La microscopía confocal demostró que los dos SHAL se localizaron en el citoplasma de células Raji, mientras que una fracción del SHAL de hexa-arginina se localizó en el núcleo.

30 La incorporación de un péptido de hexa-D-arginina al enlazador del SHAL

(DvLPBaPPP)₂LLDo mejoró tanto la absorción como la residualización del análogo del SHAL por células Raji. En contraste con la abundante unión a la superficie celular observada con el anticuerpo Lym-1, la mayoría del (DvLPBaPPP)₂LArg6AcLLDo y del SHAL relacionado se internalizó. Parte del análogo del SHAL de hexa-arginina internalizado también se asoció con el núcleo. Estos resultados demuestran que varias propiedades importantes del SHAL, incluyendo la absorción, internalización, retención y posiblemente la distribución intracelular, se pueden mejorar o modificar conjugando los SHAL con un polipéptido corto.

Antecedentes

40 Se han utilizado diversas estrategias para administrar selectivamente químicos tóxicos o radiación en células del cáncer (DeNardo (2005) *Semin Oncol.*, 32:S27-35; Torchilin (2007)

AAPS J., 9:E128-147), para la terapia génica (Jeong *et al.* (2005) *J Control Release* 107:562-570; Xia *et al.* (2007) *J Gene Med* 10:306-315) o como herramientas para la transfección de células (Shigeta K *J Control Release* 118:262-270) y la silenciación de genes (Liu (2007) *Brief Funct Genomic Proteomic* 6:112-119). Algunos de los planteamientos más recientes utilizados para mejorar la absorción celular de los terapéuticos y otras moléculas (tintes fluorescentes, enzimas, anticuerpos y otras proteínas) implicaban la introducción de las moléculas en liposomas o micelas (Constantinides *et al.* (2008) *Adv Drug Deliv Rev* 60:757-767; Samad *et al.* (2007) *Curr Drug Deliv* 4:297-305). Se ha demostrado que estas construcciones se fusionan con la membrana de la célula, introduciendo los contenidos en el interior de la célula o transfiriendo los componentes unidos al lípido a la membrana de la célula. Otro enfoque altamente exitoso ha consistido en desarrollar anticuerpos que se focalizan en proteínas de la membrana de células específicas y en utilizar estos anticuerpos para administrar radionúclidos u otras moléculas citotóxicas en la superficie de una población específica de células (Brumlik *et al.* *Expert Opin Drug Deliv* 5:87-103; DeNardo *et al.* (1998) *Cancer Biother Radiopharm* 13:239-254; Tolmachev *et al.* (2007) *Cancer Res.* 67:2773-2782). Más recientemente, la administración intracelular se ha realizado uniendo las moléculas a transportar a "lanzaderas", transmembrana naturalmente presentes, péptidos o proteínas que atraviesan fácilmente las membranas celulares. Una de las lanzaderas de mayor éxito es un péptido de señal de localización nuclear obtenido del antígeno T SV40 (Yoneda (1997) *J Biochem* 121:811-817). Esta secuencia, otras secuencias peptídicas derivadas del dominio de transducción de la proteína Tat del VIH-1 (Schwarze *et al.* (1999) *Science* 285:1569-1572; Torchilin *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 100:1972-1977), penetratina (Tseng *et al.* (2002) *Mol Pharmacol.* 62:864-872), y proteínas

intactas como la proteína del herpes virus VP22 (Phelan *et al.* (1998) *Nat Biotechnol* 16:440-443) y anticuerpos anti-ADN (Avrameas *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Set, EE.UU.*, 95:5601-5606) se utilizan actualmente para facilitar el transporte de liposomas, virus, enzimas, anticuerpos y varias otras proteínas hasta las células. También se ha conseguido un éxito considerable utilizando transportadores de péptidos catiónicos sintéticos como la oligoarginina (Futaki (2005) *Adv Drug Deliv Rev* 57:547-558; Han *et al.* (2001) *Mol Cells* 12:267-271; Kim *et al.* (2007) *Int J Pharm* 335:70-78; Tung y Weissleder (2003) *Adv Drug Deliv Rev* 55:281-294), poli-L-lisina lactosilada (Midoux *et al.* (1993) *Nucleic Acids Res* 21:871-878) y secuencias peptídicas cortas seleccionadas de bibliotecas que presentan fagos (Kamada *et al.* (2007) *Biol Pharm Bull* 2007, 30:218-223) que exhiben 10 similitudes de secuencia con lanzaderas de péptidos conocidas.

Recientemente, se han sintetizado varias reproducciones de anticuerpos de moléculas pequeñas que parecen prometedoras como agentes de selección de diana para la captura de imágenes o la terapia del cáncer [24-28]. Además de exhibir selectividades y afinidades (nM a pM) similares a los anticuerpos, estas moléculas ofrecen el potencial de minimizar algunas de las dificultades asociadas al uso de sistemas de administración de fármacos basados en proteínas. Estos conservan las propiedades farmacocinéticas más deseables de las moléculas pequeñas, es menos probable que sean inmunogénicos, pueden resultar lo suficientemente estables para la administración oral y los costes asociados a la producción del fármaco se pueden reducir de forma significativa. La familia de los SHAL de las reproducciones de anticuerpos también se pueden modificar fácilmente para transportar metales radiactivos, diversas etiquetas que permiten su uso como agentes de captura de imágenes y otras moléculas pequeñas (por ejemplo, toxinas o inhibidores). Otra modificación potencialmente útil incluye alteraciones que facilitan la absorción e internalización del SHAL por parte de la célula diana, lo que cabría esperar que aumente el tiempo de estancia en el tumor y que administre el SHAL en un entorno (el citoplasma o el núcleo) en el que pueda causar daños adicionales.

Trabajando con un SHAL desarrollado con anterioridad para focalizar en el HLA-DR10, un receptor de superficie celular abundante sobreexpresado en las células B malignas, sintetizamos un péptido análogo al SHAL conjugándolo con hexa-arginina, un péptido que se ha demostrado anteriormente que facilita el transporte de proteínas y ácidos nucleicos a las células. Los estudios de unión realizados con el SHAL y su análogo de hexa-arginina *in vitro* utilizando células Raji que expresan HLA-DR10 demuestran que la secuencia de hexa-arginina cambió de forma significativa las propiedades de los SHAL, mejorando tanto la internalización del SHAL como la residualización del radionúclido.

Métodos

Diseño de SHAL

El proceso utilizado para crear un modelo de homología para el HLA-DR10, identificar cavidades de unión únicas dentro del epítipo de Lym-1, seleccionar ligandos que se unen a estas cavidades y crear el (DvLPBaPPP)₂LLDo SHAL ha sido documentado con anterioridad (Balhorn *et al.* (2007) *Clin Cancer Res* 13:5621s-5628s). Se desarrolló un proceso para producir un análogo del péptido de hexa-arginina de este SHAL relacionado, (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo, modificando la síntesis para incluir la incorporación de un residuo de lisina adicional en el medio del enlazador que conecta los dos monómeros del SHAL y unir un hexapéptido de arginina a la amina libre en esta lisina.

Síntesis de SHAL

Se sintetizaron los dos SHAL diméricos (DvLPBaPPP)₂LLA y (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA en resina de cloruro de clorotritilo utilizando residuos de lisina (L) protegidos ortogonalmente y miniPEG (P) para unir los dos ligandos pequeños Dv y Ba como se ha descrito anteriormente para (DvLPBaPPP)₂LLA (Balhorn *et al.* (2007) *Clin Cancer Res* 13:5621s-5628s; Hok *et al.* (2007) *Bioconjug Chem* 18:912-921). Para producir el derivado amino del SHAL de hexa-arginina (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA, se insertó un segundo residuo de lisina Dde-D-Lys(Fmoc)-OH en el enlazador durante la síntesis de SHAL realizando dos pasos de acoplamiento secuenciales de Dde-D-Lys(Fmoc)-OH. En la posición alfa de la tercera lisina, se insertaron seis residuos de arginina consecutivos reaccionando la resina con Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH en seis ocasiones. El sexto residuo de Arg se protegió con un acetato (Ac) haciéndolo reaccionar con anhídrido acético en N,N diisopropil-etilamina (DIEA)/dimetilformamida (DMF). Los grupos de guanidinio de los seis residuos de arginina permanecen protegidos con grupos de protección de 2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) sensibles a ácido trifluoroacético (TFA) durante el resto de la síntesis. El resto de la síntesis se completó después tal y como se ha descrito anteriormente para (DvLPBaPPP)₂LLA (*Id.*). Se realizó una HPLC analítica y una espectrometría de masas tipo electrospray para confirmar la pureza y la identidad de los SHAL de amina libre (DvLPBaPPP)₂LLA y (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA.

(DvLPBaPPP)₂LLA:

Partiendo de 50 mg (0,07 mmol) de resina y 30 mg (0.07 mmol) de Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, se aislaron 34 mg de (DvLPBaPPP)₂LLA (Rt = 7,86 min, Waters Symmetry C18, 5 µm, columna de 4,2 x 150 mm, detector de array de diodos con un gradiente lineal del 95% de H₂O, 1% de

TFA a 80% de acetonitrilo (MeCN), 1% TFA durante 12 min) en forma de sólido rojo tras la purificación. ESI-MS: *m/z* calculado para $C_{150}H_{224}N_{34}O_{41}S_2$ ($M + 3H$)³⁺ 1075,60, dio un resultado de 1075,62; calculado para ($M + 4H$)⁴⁺ 806,95, dio un resultado de 806,93; calculado para ($M + 5H$)⁵⁺ 645,76, dio un resultado de 645,68; calculado para ($M + 6H$)⁶⁺ 538,30, dio un resultado de 538,21.

5 **(DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA:**

Se aislaron 81 mg de (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA (Rt = 8,30 min) partiendo de 90 mg

(0,12 mmol) de resina y 154 mg (0,29 mmol) de Fmoc-D-Lys(Boc)-OH en forma de sólido rojo tras la purificación. ESI-MS: *m/z* calculado para $C_{194}H_{310}N_{60}O_{49}S_2$ ($M + 3H$)³⁺ 1444,71, dio un resultado de 1444,65; calculado para ($M + 4H$)⁴⁺ 1083,76, dio un resultado de 1083,78; calculado para ($M + 5H$)⁵⁺ 867,23, dio un resultado de 867,18; calculado para ($M + 6H$)⁶⁺ 722,86, dio un resultado de 722,78; calculado para ($M + 7H$)⁷⁺ 619,74, dio un resultado de 619,62.

10 **Unión del DOTA a los SHAL**

El análogo de la amina del SHAL (precursor del DOTA-SHAL con una amina épsilon libre en la primera lisina) se disolvió en 500 µl de DMF anhidroso y 100 µl de DIEA. La sal de hexafluorofosfato (PF₆) de DOTA N-hidroxisuccinimida (NHS) éster (933,36 g/mol, 1-1,5 equivalentes) se añadió a la mezcla en forma de sólido. La mezcla se sometió a nutación durante 15 minutos y la reacción se controló por HPLC analítico. Una vez completada, la solución de la reacción se diluyó con 300 µl de H₂O y 300 µl de MeCN (ambos contenían un 1% de TFA) y se purificó por HPLC utilizando un gradiente de 85% de H₂O (0,1% de TFA) para 70% de MeCN (0,1% de TFA) durante 25 min. Los DOTA-SHAL purificados resultantes fueron liofilizados y posteriormente analizados por HPLC analítico (Waters Symmetry C18, 5µm, columna de 4,2 x 150 mm, detector de array de diodos), utilizando un gradiente lineal de 95% de H₂O (1% TFA) a 80% de MeCN (1% de TFA) durante 12 min) y se caracterizaron por ESI-MS.

20 **(DvLPBaPPP)₂LLDo:**

La reacción del SHAL (DvLPBaPPP)₂LLA amina (6,0 mg, 1,86 µmol) con DOTA NHS éster (2,0 mg, 2,14 µmol) dio una conversión del 100% (Rt = 7,664 min) por HPLC analítico en bruto y produjo (DvLPBaPPP)₂LLDo (8,0 mg, sólido rojo) tras la purificación.

ESI-MS: *m/z* calculado para $C_{166}H_{250}N_{38}O_{48}S_2$ ($M + 2H$)²⁺ 1806,09, dio un resultado de 1806,22; calculado para ($M + 3H$)³⁺ 1204,40, dio un resultado de 1204,49; calculado para ($M + 4H$)⁴⁺ 903,55, dio un resultado de 903,61; calculado para ($M + 5H$)⁵⁺ 723,04, dio un resultado de 723,07; calculado para ($M + 6H$)⁶⁺ 602,70, dio un resultado de 602,64.

30 **(DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo:**

La reacción del SHAL (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA amina (15,0 mg, 3,46 µmol) con DOTA NHS éster (5,0 mg, 5,36 µmol) dio una conversión del 100% (Rt = 7,70 min) por HPLC analítico en bruto y produjo (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo (12,0 mg, sólido rojo) tras la purificación. ESI-MS: *m/z* calculado para $C_{210}H_{336}N_{64}O_{56}S_2$ ($M + 3H$)³⁺ 1573,51,

dio un resultado de 1573,54; calculado para ($M + 4H$)⁴⁺ 1180,38, dio un resultado de 1180,43; calculado para ($M + 5H$)⁵⁺ 944,51, dio un resultado de 944,52; calculado para ($M + 6H$)⁶⁺ 787,26, dio un resultado de 787,26; calculado para ($M + 7H$)⁷⁺ 674,94, dio un resultado de 674,88; calculado para ($M + 8H$)⁸⁺ 590,69, dio un resultado de 590,58.

40 **Radioquímica**

Tal y como se ha descrito anteriormente (*Id.*), los DOTA-SHAL se etiquetaron con ¹¹¹InCl₃ sin vehículo (MDS Nordion, Vancouver, Canadá) utilizando el método siguiente (DeNardo *et al.* (2007) *J Nucl Med* 48:1338-1347). Se añadió una parte alícuota de ¹¹¹InCl₃ (15-20 µl) a una solución DOTA-SHAL (25-50 µg) en 0,1 M de NH₄OAc, pH 5,3 (50 µl); se ajustó el pH final de la mezcla de la reacción a 6,5 añadiendo 4M de NH₄OAc y la mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C; después se añadieron 10-20 µl de 0,1 M de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para aislar el exceso de ¹¹¹In³⁺ libre. El producto radioetiquetado se purificó utilizando HPLC, seguido de diálisis en tampón fosfato salino (PBS) con un corte de membrana de 1 kD. La pureza de los SHAL etiquetados con ¹¹¹In se determinó por cromatografía de capa fina (TLC) (10% NH₄OAc-MeOH 1:1), HPLC y electroforesis de acetato de celulosa (CAE). La CAE resolvió los ¹¹¹In-DOTA-SHAL e ¹¹¹In-EDTA; se observaron picos radiactivos a 2,3-3,0cm y > 6,5cm, respectivamente. En el ensayo de TLC se observaron resultados similares; los ¹¹¹In-DOTA-SHAL mostraron una escasa migración desde el punto de aplicación (R_p = 0.25-0.3), mientras que ¹¹¹In-EDTA se desplazó hacia la parte delantera del solvente (R_F = 0.5). Conforme a la HPLC, ¹¹¹In-EDTA se eluyó a 2,5-3,0 ml y ¹¹¹In-DOTA-SHAL a 9,5-10 ml. Los SHAL etiquetados con ¹¹¹In se purificaron utilizando RP-HPLC o una membrana de diálisis de 1kD en PBS, y se concentró utilizando un Savant Speedvac SCI110 (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, EE.UU.). La pureza radioquímica final se determinó utilizando C18-RP-TLC (EM Science, DC-Plastikfolien kieselgel 60 F254, Cherry Hill, NJ), HPLC y CAE. El rendimiento del producto ¹¹¹In-DOTA-SHAL se situó entre el 70 - 90% y la pureza del producto entre el 90 - 95%. El producto final se disolvió en 10% dimetilsulfóxido (DMSO) en PBS y se mantuvo estable durante 72 horas a temperatura ambiente.

Unión de SHAL a proteína de HLA-DR10 aislada

Los experimentos de unión de proteína se realizaron utilizando la resonancia de plasmones superficiales en un Biacore 3000 (Biacore, Piscataway, NJ) a 25°C. Un fragmento inmovilizado de estreptavidina de grado investigacional (SA chip, Biacore) se precondicionó y normalizó según las instrucciones del fabricante. Los SHAL etiquetados con biotina se disolvieron en DMSO y se diluyeron en 1,05X PBS (Biacore) hasta una concentración final de IX PBS pH 7,4, 5% DMSO, para equipararse al tampón de migración. Estos SHAL se inyectaron en la célula de flujo para obtener una densidad de superficie de 500-1000RU (unidades de respuesta). Se inyectó biotina (50µM E-Z Link Amine-PEO2-Biotin, Pierce) sobre todas las células durante un minuto a 20µl/min como bloqueo para reducir la unión no específica. Se utilizó una célula de flujo como célula de referencia y se inmovilizó un SHAL diferente en cada una de las otras tres células.

Los experimentos para medir la unión de HLA-DR10 a los SHAL se realizaron a una velocidad de flujo de 30µl/minuto en un tampón de migración PBS pH7.4 utilizando las cuatro células de flujo. El HLA-DR10 aislado de células Raji (Rose *et al.* (1996) *Cancer Immunol Immunother* 43:26-30) se diluyó en tampón de migración hasta una concentración final de entre 10nM y 1µM, y se produjeron diversas concentraciones aleatoriamente por triplicado. Se inyectó proteína durante tres minutos, se dejó disociar durante cinco minutos seguido de regeneración de la superficie utilizando una inyección de un minuto de 0,1% de sodio dodecilsulfato (SDS) seguido de un paso de lavado con una inyección de dos minutos de tampón de migración. Los datos, que doblemente referenciados por sustracción de la superficie de referencia de blanco y una media de cinco inyecciones blanco, se procesaron utilizando el programa SCRUBBER (Universidad de Utah).

Ensayo de unión celular

Las células B de linfoma de Burkitt humano Raji (American Type Culture Collection, Manassas, VA) se mantuvieron en medios RPMI-1640 suplementados con 10% de suero bovino fetal, 2mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 1% de una solución de aminoácidos no esenciales (GIBCO #11140-050), y 100 unidades/ml de penicilina G, 100µg/ml de estreptomycin, y 0,25 µg/ml de anfotericina B a 37°C en una atmósfera de CO₂ humidificada al 5%. Las células Jurkat (American Type Culture Collection, Manassas, VA), una línea de células T de leucemia aguda, se mantuvieron en el mismo medio añadiendo 10mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-l- piperazinaetanosulfónico (HEPES).

Se realizó una serie de experimentos para cuantificar la absorción del SHAL relacionado etiquetado con ¹¹¹In (DvLPBaPPP)₂LLDo y de su análogo hexa-arginina (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo por parte de células Raji, una línea de células que se había demostrado con anterioridad que expresa la variante HLA-DR10. Los ensayos se realizaron utilizando partes alícuotas que contenían 10⁶ células suspendidas en 150µl de PBS con 5% de albúmina de suero bovino (BSA). Las partes alícuotas de las células se trataron con 0,1, 1,5, 10 o 25 ng de (DvLPBaPPP)₂LLDo etiquetado con ¹¹¹In (DvLPBaPPP)₂LLDo o (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo durante una hora a 4°C y 22°C. Los tubos que contenían las células tratadas se centrifugaron para separar las perlas de células del supernatante y las dos fracciones se sometieron a recuento en un contador gamma de pocillos para determinar la cantidad de SHAL unido y libre. La mitad de las perlas de células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron a 22° C durante 15 min antes de centrifugarlas de nuevo. Los conjuntos de lavados y las perlas de células lavadas se sometieron posteriormente a recuento en el contador gamma de pocillos para valorar la cantidad de SHAL unido que se podría eliminar por lavado.

Microscopía confocal en 3D

La unión de SHAL y la internalización en células Raji y Jurkat se valoraron utilizando el método anteriormente descrito por O'Donnell *et al.* (O'Donnell *et al.* (1998) *Prostate* 37:91-97). Se realizaron experimentos para comparar la unión de (DvLPBaPPP)₂LLDo (el SHAL principal), su análogo de hexa-arginina (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo, y Lym-1 quimérico (chLym-1) a células Raji. Todos los pasos se realizaron a 20° C, salvo indicación.

Cuatro millones de células Raji (>92% de viabilidad) en crecimiento en fase logarítmica se convirtieron en perlas a 300 x g, se lavaron y se bloquearon durante 30 min en 1 ml de un 1% BSA (fracción V) en PBS, con rotación constante. A continuación, las células se incubaron durante 1 hora, a un millón por 250µl, con un 1% BSA en PBS o bien en un reactivo primario biotinilado: 10nM de chLym-1, 10 µM de SHAL relacionado, o 10 µM de SHAL de hexa-arginina. Después de cuatro lavados (dos en 1% BSA en PBS, dos en PBS), 50µl de las suspensiones celulares se aplicaron sobre portaobjetos recién recubiertos con poli-L-lisina, y se dejó que las células se adhiriesen durante 10 min en una cámara húmeda. La fijación y permeabilización se realizaron a -20° C utilizando la exposición a metanol durante 4 min. Las células Jurkat se trataron de la misma manera como control.

A continuación, los portaobjetos se lavaron dos veces en PBS y se bloquearon en un 10% de suero fetaplex (Gemini Bioproducts, West Sacramento, CA) en PBS durante 15 min y se lavaron una vez en PBS. El reactivo de detección, Streptavidin AlexaFluor 610 (Invitrogen, Carlsbad, CA) se diluyó 1/500 en diluyente, se aplicaron 100µl; se aplicó una película de parafina plástica sobre la solución para evitar la

evaporación. Los portaobjetos se incubaron en una cámara húmeda durante 30 minutos, se lavaron cinco veces durante 5 min cada uno en PBS, y se enjuagaron brevemente en agua doblemente destilada. Una vez que los portaobjetos se secaron, se montaron cubreobjetos con ProlongGold con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen, Carlsbad, CA) Los portaobjetos se visualizaron con un microscopio confocal de barrido láser FV1000 Olympus y los datos se recopilaron como Z-scans a 160X, con secciones focales de 1 μm de separación en la célula.

Análisis estadístico

Los datos reflejados representan la media \pm de la desviación típica. Las comparaciones estadísticas se basaron en la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon (Hollander y Wolfe (1973) *Nonparametric statistical methods*. Nueva York: Wiley Publications), un procedimiento basado en los rangos de los valores de dos grupos de ensayo. Las diferencias se consideraron significativas desde el punto de vista estadístico cuando los valores p eran $\leq 0,05$. Los valores p se determinaron por la transformación $Z = \text{TANH}^{-1}r$ para los coeficientes de correlación (CRC 15 *Handbook of Tables for Probabilities and Statistics*. 2ª ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 1968).

Resultados

Diseño y síntesis de SHAL

Dos formas del SHAL de amina libre, (DvLPBaPPP)₂LLA, y el análogo de hexa-arginina, (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA, se sintetizaron en cantidades de multimiligramos

y se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se unió una biotina al grupo 8-amino de la amina terminal (A) tanto del (DvLPBaPPP)₂LLA como del (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA para producir formas biotiniladas para su uso en experimentos de unión de células y proteínas. Se unió ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) tanto a (DvLPBaPPP)₂LLA como a (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA al mismo tiempo, para poder etiquetar los SHAL con ¹¹¹In. El SHAL de DOTA (DvLPBaPPP)₂LLDo (Figura 25A) y el análogo del SHAL de hexa-arginina (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo (Figura 25B) se etiquetaron con ¹¹¹In a alta eficiencia (>90 %) con actividades específicas de entre 70-85 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHAL. Los análisis del SHAL radioetiquetado resultante por HPLC y electroforesis de acetato de celulosa (CAE) demostraron que la pureza del producto era superior al 90%. Se utilizaron D- isómeros de arginina incorporados durante la síntesis de la secuencia de hexa-arginina en (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo para minimizar la susceptibilidad proteolítica del péptido. A pesar de que es necesario realizar experimentos más detallados para valorar convenientemente la estabilidad del SHAL *in vivo*, los datos obtenidos de un experimento preliminar con CAE no mostraron evidencia de degradación cuando el análogo del SHAL de hexa-D-arginina se incubó en plasma humano a 37°C durante 24 horas (datos no mostrados).

Afinidad del SHAL con la proteína de HLA-DR10

Se realizaron estudios de unión de resonancia de plasmones superficiales con los dos SHAL para estimar y comparar la afinidad de ambos con la proteína del HLA-DR10 aislado. En una serie de experimentos cinéticos en los que las versiones biotiniladas de los SHAL se inmovilizaron sobre la superficie de un fragmento de estraptavidina, se observó que el SHAL relacionado (DvLPBaPPP)₂LLDo se une a HLA-DR10 con una Kd aproximada de 21 nM. Se obtuvo una Kd similar (aprox. 34 nM) para el análogo que contiene hexa-arginina (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo.

Análisis de la absorción de SHAL por células Raji expresando HLA-DR10

Se realizaron experimentos de unión de células *in vitro* utilizando el SHAL relacionado etiquetado con ¹¹¹In y el análogo del SHAL de hexa-arginina para cuantificar la absorción de SHAL y para evaluar el efecto de añadir el marcador de hexa-arginina. La absorción se valoró utilizando células Raji, una línea de células de linfoma expresando HLA-DR10. Las partes alícuotas que contenían 10⁶ células se incubaron con cantidades crecientes de SHAL que contenían SHAL etiquetado con ¹¹¹In como trazador, y se midió el ¹¹¹In asociado a células antes y después de lavar las perlas de células.

Los análisis de las perlas de células no lavadas demostraron que las células Raji se unen tanto al SHAL relacionado como al SHAL de hexa-arginina. En ambos casos, el SHAL asociado a células aumentó linealmente a medida que se incrementaba la concentración de SHAL en los medios (Figura 26), y la cantidad de SHAL unido no mostró evidencia de alcanzar la saturación en el rango de concentración de SHAL sometido a ensayo. Las células Raji tratadas con el SHAL de hexa-arginina, a diferencia de las tratadas con el SHAL relacionado, se unen al SHAL dos veces más (Tabla 9). Una proporción mayor

del SHAL de hexa-arginina (67%) también fue retenida por las células tras el lavado en comparación con el SHAL relacionado (aprox. 46%), provocando un contenido final del SHAL de hexa-arginina que triplicaba el de su SHAL relacionado.

Tabla 9. Retención (residualización) de SHAL unido por células Raji. Las muestras de células idénticas utilizadas en experimentos que se muestran en la Figura 27 se incubaron tal y como se ha descrito anteriormente con 5,3 pmoles de (DvLPBaPPP)₂LLDo etiquetado con ¹¹¹In o (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo y, a continuación, se lavaron dos veces con BSA/tampón. A continuación, las perlas de células se

sometieron a conteo para obtener estimaciones del SHAL que permanece unido tras el lavado.

SHAL	pmoles SHAL unido/10 ⁶ células		Porcentaje SHAL retenido
	Sin lavado	Con lavado	
(DvLPBaPPP) ₂ LLDo	0,568 ± 0,091	0,263 ± 0,000	46
(DvLPBaPPP) ₂ LArg ₆ AcLLDo	1,300 ± 0,038	0,876 ± 0,017	67

Localización de SHAL por microscopía confocal en 3D

5 Las imágenes de fluorescencia obtenidas en planos focales cercanos al centro de las células Raji tratadas con formas biotinizadas del SHAL relacionado y el SHAL de hexa-arginina durante solo una hora confirmaron que ambos SHAL eran absorbidos por las células Raji (Figura 27). A diferencia del anticuerpo Lym-1, que se une al HLA-DR10 en la superficie de la célula, las imágenes seccionadas tomadas del centro de las células mostraron que ambos SHAL se localizaron en el interior de las células Raji y se distribuyeron por todo el citoplasma. Las células Raji absorbieron una cantidad significativamente mayor del SHAL de hexa-arginina que del SHAL relacionado, tal y como se evidencia por la tinción más intensa de los citoplasmas de las células tratadas con concentraciones equivalentes de los dos SHAL. La absorción de SHAL no se observó en las células Jurkat de control (células que carecen del HLA-DR10). Una fracción del SHAL de hexa-arginina también pareció estar asociada con el núcleo. La tinción nuclear no se observó en las células tratadas en el SHAL relacionado.

Debate

15 Numerosos péptidos que penetran en las células (CPP) obtenidos de proteínas virales y otras proteínas que atraviesan las membranas celulares y nucleares han sido empleados como lanzaderas para mejorar la eficiencia de transporte de liposomas, proteínas y ácidos nucleicos exógenos, y otras moléculas hasta el citoplasma y los núcleos de las células (Schwarze *et al.* (1999) *Science* 285:1569-1572; Torchilin *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 100:1972-1977; Tseng *et al.* (2002) *Mol Pharmacol* 62:864-872; Phelan *et al.* (1998) *Nat Biotechnol* 16:440-443; Avrameas *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 95:5601-5606; Futaki (2005) *Adv Drug Deliv Rev* 57:547-558; Han *et al.* (2001) *Mol Cells* 12:267-271; Kim *et al.* (2007) *Int J Pharm* 335:70-78; Tung y Weissleder (2003) *Adv Drug Deliv Rev* 55:281-294; Midoux *et al.* (1993) *Nucleic Acids Res* 21:871-878; Kamada *et al.* (2007) *Biol Pharm Bull* 2007., 30:218-223). Los estudios que caracterizan la eficiencia de internalización de diferentes secuencias de CPP, todas ellas con un elevado contenido de residuos de arginina (Futaki (2006) *Biopolymers* 84:241-249), han demostrado que los homopolímeros de arginina que contienen tan solo seis residuos

de arginina resultan altamente efectivos para transportar pequeñas moléculas orgánicas (Kirschberg *et al.* (2003) *Org Lett* 5:3459-3462; Rothbard *et al.* (2000) *Nat Med* 6:1253-1257) y proteínas de gran tamaño hasta las células (Futaki *et al.* (2001) *J Biol Chem* 276:5836-5840).

En un esfuerzo por desarrollar SHAL que sean más eficientemente internalizados y residualizados por sus células diana, sintetizamos un conjugado de hexa-arginina de (DvLPBaPPP)₂LLDo, un SHAL que contiene los dos ligandos dabsilvalina (Dv) y ácido N- benzoil-L-arginil-4-amino benzoico (Ba) que se había demostrado con anterioridad que se unen selectivamente a las líneas de células que expresan HLA-DR10 (Balhorn *et al.* (2007) *Clin Cancer Res* 13:5621s-5628s). La hexa-arginina fue seleccionada como la primera secuencia de lanzadera sometida a ensayo para determinar su capacidad para facilitar el transporte de los SHAL a las células, porque se podría conjugar con un SHAL dimérico sin variar su masa molecular de forma significativa, preservando así las propiedades deseables del SHAL como pequeña molécula terapéutica. Los experimentos de resonancia de plasmones superficiales con los que se comparó la unión del SHAL y del análogo del SHAL de hexa-arginina a la proteína purificada del HLA-DR10 demostraron que la adición del péptido de hexa-arginina al SHAL dimérico no interfería en la unión del SHAL a la proteína.

Los experimentos de microscopía confocal en 3D han revelado que tanto el SHAL principal como su análogo de hexa-arginina fueron absorbidos e internalizados por las células Raji expresando HLA-DR10. La absorción de SHAL no se observó en las células Jurkat, una línea de células que carece de HLA-DR10. Las secciones ópticas tomadas de células Raji demostraron que la unión del SHAL no se limitaba a la superficie celular, como es característico en la unión del anticuerpo Lym-1. Las secciones del plano medio tomadas de las células tratadas con los SHAL demostraron que la fluorescencia asociada al SHAL se puede distribuir por todo el interior de las células. En algunas imágenes, las áreas de alta concentración de SHAL en el citoplasma ocasionalmente aparecían asociadas con pequeñas estructuras similares a orgánulos. La fluorescencia asociada al citoplasma era significativamente mayor en las células Raji tratadas con el análogo del SHAL de hexa-arginina, lo que sugiere que la adición del péptido de hexa-arginina mejoró la absorción celular del SHAL.

Los experimentos en los que se comparaba la unión de (DvLPBaPPP)₂LLDo etiquetado ¹¹¹In y

(DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo a células Raji vivas confirmaron que el marcador de hexa-arginina mejora la absorción de SHAL. La presencia del marcador también aumentó la cantidad de SHAL etiquetado ¹¹¹In retenido por las células Raji. La cantidad de SHAL retenida tras el lavado no alcanzó la saturación con respecto al rango de concentración ensayado, lo que sugiere que se pueden acumular concentraciones incluso superiores de SHAL en el interior de las células expresando HLA-DR10 a las alcanzadas en estos experimentos. A la concentración máxima de SHAL de hexa-arginina ensayada en los estudios de unión celular, la cantidad de SHAL residualizada era equivalente aproximadamente a 1,1 x 10⁶ moléculas de SHAL por célula - el mismo número de moléculas de HLA-DR10 cuya presencia sobre la superficie de células Raji se había documentado con anterioridad (Epstein *et al.* (1987) *Cancer Res* 47:830-840). Estos resultados, junto con las imágenes confocales que muestran que la mayoría del SHAL de hexa-arginina se internaliza, indican que una fracción significativa del SHAL se puede unir al grupo de HLA-DR10 que se sabe que está presente en el interior de la célula.

La mejora observada en la residualización del SHAL de hexa-arginina etiquetado ¹¹¹In por parte de las células Raji y la potencial asociación de un fracción de la etiqueta de ¹¹¹In con el núcleo también son importantes porque la residualización y la internalización del radioisótopo han demostrado resultar altamente ventajosos para la terapia del cáncer (Brouwers *et al.* (2003) *Clin Cancer Res* 9:3953S-3960S; Chen *et al.* (2006) *J Nucl Med* 2006, 47:827-836; Michel *et al.* (2002) *Clin Cancer Res* 8:2632-2639; Stein *et al.* (1995) *Clin Cancer Res* 11:2727-2734). Los terapéuticos para el cáncer se han vinculado a diversos radioisótopos que emiten partículas beta, partículas alfa o electrones Auger. El rango de emisiones beta de los radioisótopos rutinariamente utilizados en la radioinmunoterapia, como el yodo-131, el itrio-90 y el renio-188, se amplía en varios milímetros, y los terapéuticos que portan estos radionúclidos generan un efecto de "fuego cruzado" (DeNardo (2005) *Semin Oncol.*, 32:S27-35; Bischof (2003) *Leuk Lymphoma* 44 Suppl 4:S29-36) o "espectador" (Boyd *et al.* (2006) *J Nucl Med* 47:1007-1015) que destruye las células malignas a las que el agente de selección de diana no se une directamente. De este modo, los beta-emisores pueden potencialmente superar la resistencia debida a las células tumorales antígeno negativas. Estas características hacen que la terapia de beta-partículas resulte más adecuada para tratar grandes tumores o enfermedades. Sin embargo, las beta-emisiones de rango más largo también pueden destruir las células normales cercanas.

La internalización de agentes de selección de diana como el SHAL de hexa-arginina

(DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo se pueden explotar como medio para introducir el ¹¹¹In que emite el electrón Auger en el citoplasma y el núcleo de las células en las que los electrones Auger tienen una longitud de ruta subcelular muy limitada y una elevada transferencia de energía lineal (Bodei *et al.* (2003) *Cancer Biother Radiopharm* 18:861-877; Kassis (2003) *J Nucl Med* 44:1479-1481; McDevitt *et al.* (1998) *Eur J Nucl Med* 25:1341-1351). Se ha estimado que la dosis de radiación absorbida por el núcleo es dos veces y 35 veces mayor cuando ¹¹¹In se descompone en el núcleo en comparación con la absorbida cuando la descomposición se produce en el citoplasma o en la superficie celular, respectivamente (Goddu *et al.* (1994) *J Nucl Med* 35:303-316; Hindorf *et al.* (2007) *Cancer Biother Radiopharm* 22:357-366). Estas propiedades hacen que ¹¹¹In y otros emisores de electrones Auger resulten altamente citotóxicos y nocivos para el ADN cuando se descompone en las proximidades del núcleo celular (Costantini *et al.* (2007) *J Nucl Med* 48:1357-1368). Con el acoplamiento de los emisores Auger a los agentes de selección de diana de residualización y altamente selectivos que se acumulan a concentraciones elevadas en el interior de las células tumorales, se puede desarrollar una clase muy potente de terapéuticos que son más efectivos para tratar muchos tipos de cáncer metastásico.

Conclusiones

La mejora de la internalización del SHAL de hexa-arginina por las células de linfoma expresando HLA-DR10 y la magnitud del aumento de la residualización del SHAL que se consigue al conjugar un péptido de hexa-arginina con el SHAL son importantes porque demuestran que se pueden diseñar moléculas pequeñas como los SHAL para llevar radionúclidos a las células malignas en condiciones que llevan a la residualización de concentraciones significativas de radionúclido dentro de la célula. Los SHAL que contienen radionúclidos que emiten electrones Auger pueden proporcionar un enfoque alternativo para aumentar el índice terapéutico que se consigue con los SHAL por encima del alcanzado con la acumulación de agentes de selección de diana marcados con radionúclido sobre la superficie de la célula tumoral. Estos resultados también son interesantes por la relevancia del enfoque basado en SHAL para tratar otras formas de cáncer. Internalizando los SHAL de selección de diana bajo MUC1 glicosilado, también se podría desarrollar el receptor de andrógeno y otras proteínas de superficie celular específicas tumorales que residualizan los radioisótopos que portan en forma de moléculas pequeñas para una amplia variedad de otros tipos de cáncer metastásico.

Abreviaturas utilizadas en este ejemplo.

Ac, acetato; Ba, ácido N-benzoil-L-arginil-4-amino benzoico; Boc, butiloxicarbonilo terciario; BSA, albúmina de suero bovino; CAE, electroforesis en acetato de celulosa; CPP, péptido de penetración celular; DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol; Dde, 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)etilo; DIEA, N,N-Diisopropil-etilamina; DMF, dimetilformamida; DMSO, dimetilsulfóxido; DOTA, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético; Dv, dabsilvalina; EDTA, ácido etilendiaminatetraacético;

ESI- MS, espectrometría de masas de ionización por electrospray; Fmoc, fluorenilmetiloxi; HEPES, ácido 4-(2- hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico; HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento; MeCN, acetonitrilo; NHS, N-hidroxisuccinimida; Pbf, 2,2,4,6,7-Pentametilidihidrobenzofuran-5-sulfonilo; PBS, solución tampón salina de fosfato; PF6, hexafluorofosfato; RP-HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa; SDS, dodecilsulfato de sodio; SHAL, ligando de alta afinidad selectivo; TFA, ácido trifluoroacético; TLC, cromatografía de capa fina.

Ejemplo 6

Citotoxicidad selectiva celular y específica molecular inducida por un nuevo compuesto sintético que imita el anticuerpo HLA-DR para el linfoma y la leucemia.

Resumen

Al igual que el rituximab, los anticuerpos monoclonales reactivos con el antígeno de leucocito, humano ofrecen una potente actividad contra el linfoma. Sin embargo, su tamaño limita su penetración vascular y tisular. Para imitar la unión del anticuerpo monoclonal, se han sintetizado nanomoléculas, que se ha demostrado que son específicas para la subunidad B del HLA-DR10, y selectivas para las células expresando esta proteína. Se residualizaron ligandos de alta afinidad selectivos (SHALs) que contienen el ligando de ácido 3-(2- ([3-cloro-5- trifluorometil)-2-piridinil]oxi)-anilino)-3- oxopropaniónico (Ct) y que tenían una actividad antilinfoma frente a las células que lo expresan. En el presente documento, demostramos la extraordinaria potencia en ratones con xenoinjertos de linfoma humano de un SHAL tridentado que contiene este ligando. Tras la titración de la actividad antilinfoma en un cultivo celular, se realizó un estudio preclínico aleatorizado de un SHAL tridentado que contiene el ligando Ct en ratones con xenoinjertos de linfoma humano establecidos y agresivos. Los ratones que tenían xenoinjertos de linfoma T de Jurkat o linfoma B de Raji que expresaban HLA-DR10 fueron asignados aleatoriamente para recibir uno de los tratamientos con SHAL a una dosis de 100 ng i.p. semanal durante tres semanas consecutivas o al grupo sin tratamiento. Las variables de valoración primarias fueron la curación, las tasas de respuesta totales y la supervivencia. También se evaluó la toxicidad en estos ratones y se realizó un estudio de seguridad general de la USFDA con ratones Balb/c sanos. En un cultivo de células Raji, las concentraciones máximas e IC₅₀ para determinar la actividad citotóxica fueron de 0,7 y 2,5 nmol (medios de pm/ml), respectivamente. Cuando se comparó con los xenoinjertos de Jurkat tratados o los xenoinjertos no tratados, los xenoinjertos de Raji tratados con el SHAL demostraron una reducción del 85% del riesgo de muerte (P=0,014; 95% de intervalo de confianza; 32-95% de reducción). No se observaron evidencias de toxicidad ni siquiera después de dosis i.p. 2000 veces superiores a la dosis de tratamiento asociada con la cura de la mayoría de los ratones con xenoinjertos Raji. En comparación con los grupos de control, el tratamiento mejoró selectivamente las tasas de respuesta y supervivencia en ratones con xenoinjertos de linfoma humano expresando HLA-DR10 a dosis no asociadas con eventos adversos y fácilmente alcanzables en pacientes.

Introducción

Las proteínas de superficie celular, tales como CD20, CD22 y MHCII HLA-DR, han demostrado ser dianas atractivas para la terapéutica para el linfoma no Hodgkin (NHL). Una de estas proteínas, el antígeno del leucocito humano (HLA) se regula al alza sobre la superficie de los linfocitos B malignos en comparación con los linfocitos B normales. Por otra parte, la proteína del HLA-DR intracelular es incluso más abundante. Las proteínas del HLA-DR sirven de receptores de señalización transmembrana y citoplásmica y como lanzaderas de péptidos para el sistema inmunitario (Leveille *et al.* (2002) *Eur. J. Immunol.* 32:2282-2289; Klemmff *al.* (1998) *Annu. Rev. Immunol.* 16:569-592; Lane *et al.* (1990) *J. Immunol.* 144:3684-3692). El anticuerpo monoclonal (MAb), Lym-1, se une a un epítipo bien caracterizado de la subunidad β del HLA-DR y reacciona con el tejido del linfoma en aproximadamente un 90 y un 50% de los pacientes con linfoma de células B y leucemia, respectivamente (DeNardo *et al.* (1998), *J. Clin. Oncol.* 16:3246-3256; Rose *et al.* 1996) *Cancer Immunol Immunother.*, 43:26-30; Rose *et al.* (1999) *Mol Immunol.* 36: 789-797). Aunque la unión se limita a la superficie celular (Epstein *et al.* (1987) *Cancer Res* 47:830-840), Lym-1 es altamente activo frente a células B malignas en cultivo y en ratones (DeNardo *et al.* (2005) *Clin. Cancer Res.*, 11: 7075-7079; Tobin *et al.* (2007) *Leuk. Lymphoma* 48:944-956, 2007; Zhang *et al.* (2007) *Cancer Biother. Radiopharm.*, 22:342-356).

Para imitar la unión de MAb al HLA-DR 10, al tiempo que se reduce el tamaño, se ha sintetizado una serie de ligandos de alta afinidad selectivos (SHAL) con un tamaño inferior a <5 kDa para unir a la región epitópica Lym-1 de la subunidad B de la proteína del HLA-DR basado en modelos *in silico* y estudios experimentales. Las versiones bidentadas de estas nanomoléculas novedosas mostraron múltiples características deseadas *in vitro* y en ratones (Balhorn *et al.* (2007) *Clin. Cancer Res.*, 13(Supl.18): S5621-S5628; DeNardo *et al.* (2007) *J. Nucl. Med.*, 48:1338-1347) pero no mostraron ninguna actividad antilinfoma (West *et al.* (2006) *Cancer Biother. Radiopharm.*, 21:645-654). Sorprendentemente, un SHAL tridentado conteniendo el ligando Ct (ácido 3-(2-([3-cloro-5-trifluorometil)- piridinil]oxi)-anilino)- 3-oxopropaniónico) se residualizó en el interior y fue citotóxico para las células de linfoma B en cultivo. Aquí, titramos la actividad antilinfoma de la célula selectiva de este SHAL, demostramos su remarcable eficacia, selectividad y seguridad en ratones con xenoinjertos de linfoma humano y demostramos pruebas de

microscopio electrónico de la autofagia inducida por el SHAL.

Materiales y métodos

Reactivos y líneas celulares

5 Se utilizó Lym-1 murino (Peregrine Pharmaceuticals, Tustin, CA) y quimérico (A. Epstein, Los Angeles, CA) que se une a la subunidad B del HLA-DR10 expresado en células B malignas (Epstein *et al.* (1987) *Cancer Res* 47: 830-840), y proteína HLA-DR10 aislada de células B Burkitt de Raji utilizando una columna de afinidad de Lym-1, tal y como se ha descrito anteriormente (Balhom *et al.* (2007) *Clin. Cancer Res.*, 13(Supl. 18): S5621-S5628) como referencias. Para estos experimentos se utilizó una línea de células de linfoma B humano expresando HLA-DR10, Raji (American Type Culture Collection, Manassas, VA), cultivada en RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino, suplementado con piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y antibióticos (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), a 37°C en atmósfera de CO₂ humidificada al 5% y una línea de células de linfoma T humano no expresante, Jurkat (American Type Culture Collection, Manassas, VA), cultivada conforme a las recomendaciones de la ATCC.

Diseño y química del fármaco

15 Utilizando modelos homólogos, se mapearon los residuos de aminoácidos de HLA-DR críticos para la unión de Lym-1 en un modelo 3D de la subunidad β del HLA-DR10 (Balhom *et al.* (2007) *Clin. Cancer Res.*, 13(Supl. 18):S5621-S5628). Las cavidades dentro de la superficie epitópica de Lym-1 de la proteína se identificaron utilizando SPHGEN (Kuntz *et al.* (1982) *J. Mol. Biol* 161:269-288; Desjarlais *et al.* (1988) *J. Med. Chem.*, 31:722-729). Tras el docking computacional del ligando para cada una de las cavidades, se utilizó una combinación de espectroscopia NMR, resonancia de plasmones de superficie (BIAcore 3000; Biacore, Piscataway, NJ) y experimentos de unión competitiva para confirmar la unión del ligando a la proteína HLA-DR10. Las series de ligandos se unieron a continuación para crear un SHAL, tal y como se ha descrito anteriormente (Balhom *et al.* (2007) *Clin. Cancer Res.*, 13(Supl. 18):S5621-S5628). Cada SHAL se sintetizó en una resina de clorotritilcloruro en una columna de polietileno (Pierce Biotechnology, Inc.) utilizando química de fase sólida Fmoc para conjugar unidades monoméricas de PEG y ligandos seleccionados a través de las aminas alfa y epsilon de la lisina S-terminal. Para sintetizar el SHAL tridentado, se unió un ligando de dabsilvalina (Dv) a la amina terminal de un separador PEG conjugado con la amina alfa del segundo residuo de lisina y se unió un ácido 4-[4-(4-clorobenzil)piperazino]-3- nitrobenzenocarboxílico (Cb) a la amina terminal de un PEG conjugado con la amina alfa de la tercera lisina. Por último, el ligando Ct también se unió a la amina epsilon de la tercera lisina (Figura 28). Se realizó la conversión a derivados SHAL DOTA (biotinilados), tal y como se ha descrito anteriormente. La reacción se controló por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y los derivados DOTA (o biotinilados) se purificaron utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC). Se utilizó espectrometría de masas de ionización por electrospray (instrumento Agilent 1100, columna Waters Symmetry C18) para confirmar la composición elemental y la masa del SHAL (peso molecular dentro del 0,07% del peso molecular teórico). Para examinar la unión de SHAL a la proteína del HLA-DR10 aislada o recombinante, se realizaron experimentos de resonancia de plasmones superficiales, como se ha descrito anteriormente (*Id.*). La unión de SHAL fue mejor que la nanomolar y se bloqueó mediante la adición de Lym-1.

Ensayo de citotoxicidad

40 Las células Raji cultivadas en fase de crecimiento log se centrifugaron, se volvieron a suspender en medio nuevo y se sometieron a recuento en 10% de colorante triptano azul para determinar la viabilidad inicial y posterior, tal y como se ha descrito anteriormente (West *et al.* (2006) *Cancer Biother. Radiopharm.*, 21:645-654). Cuando no se trataron, las células continuaron multiplicándose y las células no viables, inicialmente menos del 5% de las células totales, se mantuvieron igual durante el transcurso de los ensayos. Para la titración de la actividad citotóxica, el SHAL tridentado biotinilado a concentraciones de entre 0 y 7 nM (medio pm/ml) se incubó con 0,5x10⁶ células/ml a 37°C en atmósfera de CO₂, humidificada al 5% (NAPCO, Portland, OR). Después de uno, dos y tres días, las células se volvieron a suspender en colorante triptano azul y se sometieron a recuento en un hemocitómetro. Se determinó la viabilidad fraccional y el número absoluto de células viables y no viables (células/ml).

Eficacia y toxicidad en ratones

55 Las hembras de ratón Balb/c nu/nu atímicas de entre siete y nueve semanas de vida (Harlan Sprague Dawley, Inc., Frederick, MD) fueron mantenidas conforme a las directrices de cuidado animal de la Universidad de California en condiciones libres de patógenos y con una dieta *ad libitum* normal. Las células de Raji o Jurkat cultivadas en fase log y con una viabilidad superior al 95% fueron implantadas (6x10⁶ células) subcutáneamente en el abdomen inferior 3-4 días después de irradiar a los ratones (400 cGy) para suprimir el rechazo del xenoinjerto. Cuando los xenoinjertos alcanzaron los 20-500 mm³ medido por calibrador, los ratones se clasificaron en cuatro grupos en función del volumen de los xenoinjertos: ratones con xenoinjertos Raji tratados con SHAL, ratones con xenoinjertos Jurkat tratados con SHAL, ratones con xenoinjertos Raji no tratados y ratones con xenoinjertos Jurkat no tratados. A cada ratón se le inyectaron 100 µl de PBS o 100 ng de SHAL tridentado quelado DOTA por vía i.p. en los días 0, 7 y 14. El volumen del xenoinjerto y la supervivencia se controlaron durante ≥84 días. Los ratones también se

pesaron 2-3 veces cada semana durante cuatro semanas y, a continuación, semanalmente. Los recuentos sanguíneos se midieron antes de cada dosis de SHAL o PBS y semanalmente durante cuatro semanas tras la dosis final utilizando un Z Series Coulter Counter (Beckman Coulter Inc., Hialeah, FL) y un microscopio de contraste de fase (Zeiss, Jena, Alemania).

- 5 Los volúmenes de los xenoinjertos se calcularon mediante la fórmula para hemielipsoides (DeNardo *et al.* (1997) *Clin. Cancer Res.* 3: 71-79). Las respuestas se caracterizaron como curación, desaparición completa del xenoinjerto sin reaparición durante 84 días, remisión completa (CR) el día formal censor (>210 días hasta el presente), desaparición del xenoinjerto durante al menos siete días, aunque con reaparición, y remisión parcial (PR), reducción del volumen del xenoinjerto al menos en un 75% que se mantuvo estable durante al menos siete días. Todas las curas a los 84 días en los ratones tratados con SHAL persistieron durante un tiempo de observación de 210 días para los ratones. Si un xenoinjerto superó los 2000 mm³ el ratón se sometió a eutanasia de acuerdo con las directrices de cuidado animal de la Universidad de California y se categorizó como muerte relacionada con la enfermedad.

Seguridad en ratones

- 15 A cada uno de los tres grupos de siete ratones Balb/c sanos se les administró PBS, 20 o 200 µg de SHAL quelado DOTA por vía i.p., es decir, 200 o 2000 veces la dosis de eficacia del SHAL.

Inmediatamente antes de la intervención, los ratones fueron observados, pesados y sometidos a recuentos sanguíneos (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). A continuación, los ratones fueron observados diariamente, se pesaron tres veces por semana y se sometieron a recuentos sanguíneos semanalmente durante cuatro semanas tras la intervención.

20

Microscopía electrónica (EM)

Se cultivaron los xenoinjertos de Raji (53-132 mm³) para la EM de ratones sin tratar

- (de control) y 2, 4 o 24 horas tras la administración de 100 ng de SHAL biotinilado. Los xenoinjertos se fijaron, tal y como se describe (18) utilizando un 4% de paraformaldehído en 0,1 M solución tampón fosfato de Sorenson, pH 7.35. Tras el tratamiento con un 4% de uranil acetato en etanol 70% durante una hora y resina acrílica LR White durante toda la noche, se alcanzó la polimerización en un microondas (Pelco 34700 BioWave, Pella Inc., Redding, CA). Las secciones ultrafinas (Leica Ultracut UCT, Leica, Vienna, Austria) se capturaron sobre rejillas doradas, flotando en Streptavidin- 20 nm gold (BB International from Ted Pella Inc.), se enjuagaron y tiñeron con uranil acetato y citrato de plomo antes de la visualización con una lente Philips CM120 Biotwin Lens (FEI, Hillsboro, OR, fabricada en Eindhoven, Países Bajos y Gatan MegaScan, modelo 794/20, cámara digital (2K X 2K), Pleasanton, CA. Gatan BioScan, modelo 792, Pleasanton, CA).

25

30

Métodos bioestadísticos

- El análisis inicial comparó las tasas de respuesta mediante ensayos exactos y los tiempos de supervivencia mediante ensayos log-rank para los ratones Raji y Jurkat no tratados sin encontrar diferencias significativas, por lo que estos grupos se agruparon para el posterior análisis. Las tasas de respuesta para los Raji tratados, los Jurkat tratados y los ratones sin tratar se compararon mediante ensayos de χ^2 y exactos. Los tiempos de supervivencia se determinaron a los 84 días para los ratones que no habían fallecido o que no se habían sometido a eutanasia debido al crecimiento del tumor con anterioridad a esa fecha. Los tiempos se resumieron descriptivamente por curvas de Kaplan-Meier y se obtuvieron las medias de supervivencia y los límites de confianza del 95% mediante la estimación del límite del producto.

40

45

Los dos grupos tratados se compararon con el grupo sin tratar utilizando un ensayo log-rank para determinar la homogeneidad entre grupos, seguido de un modelo de riesgos proporcionales para estimar el efecto del tratamiento en comparación con la ausencia de tratamiento. Los análisis se realizaron con el software SAS/SAT® (SAS Institute, Inc. SAS/STAT Versión 9.0. 2004. Cary, NC: SAS Institute). Todos los ensayos fueron bilaterales a nivel 0,05.

Resultados

Ensayo citotóxico.

- 50 Cuando no se trataron, las células Raji (muertas) no viables se mantuvieron por debajo del 5% de las células totales durante los tres días de observación. Las células Raji tratadas con SHAL (en un rango de concentración de 0-70 nM (medio pm/ML) mostraron más células muertas, tanto en términos fraccionales como absolutos, en el periodo de un día en comparación con los controles sin tratar. El número máximo de células no viables se observó el día 2 a concentraciones de SHAL de entre 2,3 y 7 nM, y las concentraciones citotóxicas IC₅₀ SHAL y el umbral fueron de 0,5 y 2,5 nM (medio pm/ml), respectivamente (Figura 29).

55

Eficacia y toxicidad

La regresión en xenoinjertos Raji tratados típicamente comenzó aproximadamente a los siete días y

alcanzó la remisión completa aproximadamente a los 30 días del tratamiento inicial con el SHAL (Figura 30). A pesar de que se examinaron a los 84 días, todas las curas en xenoinjertos Raji tratados con SHAL han persistido hasta el presente, lo que supuestamente representa curas permanentes. Dado que no se observaron diferencias significativas en la respuesta y supervivencia de ratones Raji y Jurkat no tratados (P>0,08), estos se combinaron para la comparación con los ratones tratados. Los ratones con xenoinjertos Raji y tratados con SHAL tuvieron una tasa de curación del 69% y una tasa de respuesta total del 77%, unas cifras significativamente mejores que los ratones con xenoinjertos Jurkat tratados (0%) y que los ratones no tratados (respuesta del 15%) (P<0,001) (Tabla 10). Los tiempos de supervivencia medios fueron de 25 días en el caso de los ratones no tratados y de 21 días en el caso de los ratones con xenoinjertos Jurkat tratados. El tiempo de supervivencia medio de los ratones tratados con xenoinjertos Raji no fue estimable porque prácticamente todos los ratones seguían vivos a los 84 días (Figura 31). El modelo de riesgos proporcionales estimó que los ratones Raji tenían una reducción del -85% del riesgo de muerte en comparación con los ratones Jurkat no tratados y tratados (P<0,001).

Tabla 10. Ratones atímicos con xenoinjertos de linfoma, SHAL tratados o no tratados.

Tratamiento Grupo	Ratón	Respuesta (%) Cura (%)	ORR (%) ^a
Raji	13	69	77
Jurkat	9	0	0
Sin tratar	13	15	15

^aTasa de respuesta total.

Seguridad en ratones

Todos los ratones del estudio de seguridad general, incluyendo aquellos a los que se administró 2000 veces la dosis de SHAL utilizada en el ensayo de eficacia, ganaron peso, mostraron recuentos sanguíneos estables y ningún efecto adverso durante cuatro semanas de observación, superando por tanto las directrices para ensayos de "seguridad general" de la USFDA.

Microscopía electrónica

La EM de xenoinjertos Raji de ratones no tratados mostraron células sanas con membranas celulares y nucleares bien definidas, y orgánulos citoplásmicos, incluyendo endotelio reticular, Golgi y liposomas (Figura 32). Por el contrario, la EM de Raji cultivada tras el tratamiento con SHAL se caracterizó por orgánulos fragmentados y cromatina nuclear altamente condensada, lo que representa unas conclusiones coherentes con la muerte celular por autofagia (programada).

Debate

Las proteínas sobre la superficie de las células malignas se han utilizado para identificarlas y para actuar como dianas para la terapia y la captura de imágenes. La histocompatibilidad principal clase II, antígenos leucocitarios humanos (HLA) son abundantes tanto en la superficie como en el interior de los linfocitos B malignos (Epstein *et al.* (1987) *Cancer Res* 47: 830-840). Estas proteínas son importantes receptores de señalización de la muerte celular (Leveille *et al.* (2002) *Eur. J. Immunol.* 32: 2282-2289;

Lane *et al.* (1990) *J. Immunol.*, 144: 3684-3692). A pesar de que los MAbs intactos reconocen las células malignas selectivamente, el tamaño limita su eliminación de la sangre y la penetración en los tejidos. En base a las predicciones de los modelos *in silico* y ensayos empíricos, se han seleccionado pequeños ligandos orgánicos para unir a puntos de la región epitópica del MAb Lym-1 del HLA-DR10. Al unir covalentemente series de estos ligandos, se han generado SHAL para dirigir a leucemias y linfomas derivados de células B (Hok *et al.* (2007) *Bioconjug. Chem.*, 18:912-921).

Estas novedosas nanomoléculas imitan la afinidad y selectividad de los MAbs debido a las interacciones tridimensionales que tienen lugar entre múltiples ligandos en el SHAL y múltiples puntos dentro del epítipo de la proteína diana. Los SHAL son absorbidos rápidamente por los xenoinjertos expresando HLA-DR y se eliminan rápidamente de los tejidos normales (DeNardo *et al.* (2007) *J. Nucl. Med.*, 48:1338-1347) porque el SHAL es -50 veces más pequeño que una molécula de inmunoglobulina G. Los análisis histoquímicos han demostrado que los SHAL se unen a los tejidos NHL de pacientes y ratones (Balhorn *et al.* (2007) *Clin. Cancer Res.*, 13(Supl.18): 85621- S5628). Los estudios previos han demostrado que los SHAL entran rápidamente en las células, pero no abandonan las células expresando HLA-DR10 y HLA-DR relacionados, comportándose como una langosta y su trampa.

Estos SHAL cruzan las barreras celulares eficientemente, aparentemente no afectados en las células expresando HLA-DR10 por los mecanismos de bombeo celulares. Los SHAL conteniendo un ligando Ct (ácido 3-(2-([3- cloro-5- trifluorometil]-2-piridinil)oxi)-anilino)-3-oxopropaniónico) se residualizan en el interior y presentan una potente actividad antilinfoma contra las células de linfoma humano expresando

HLA-DR10 (DeNardo *et al.* (2007). *J. Nucl. Med.*, 48:1338-1347). Los presentes experimentos demuestran que el ligando Ct que contiene el SHAL tridentado con un IC₅₀ de 2,5 nM (medio pm/ml) para las células expresando HLA-DR10 en cultivo también presenta una remarcable eficacia en ratones con xenoinjertos Raji. Las curaciones permanentes se consiguieron en el 69% de estos ratones con una dosis de tratamiento de SHAL 2000 veces inferior a la dosis máxima ensayada y cuya seguridad se confirmó en ratones sanos. El efecto antilinfoma únicamente se observó en ratones con xenoinjertos expresando HLA-DR10; los xenoinjertos Jurkat no se vieron afectados por el tratamiento con el SHAL. Dado que los ratones tratados con una dosis de SHAL 2000 veces superior no mostraron signos de eventos adversos, parece que el SHAL dispone de un excepcional margen de seguridad como terapéutico potencial. En el futuro será importante realizar un estudio de respuesta a las dosis con el SHAL tridentado en ratones, a fin de averiguar si la tasa de curación se puede aumentar o no con una dosis de SHAL mayor.

Las micrografías de electrones del tejido del xenoinjerto de los ratones tratados con el SHAL confirmaron la citotoxicidad del SHAL para las células de linfoma Raji. La extensa vacuolización y la pérdida de estructura celular sugieren la posibilidad de que la unión del SHAL al HLA-DR haya inducido una señal celular que en última instancia ha provocado la apoptosis y la muerte celular autófaga. Será necesario realizar un estudio más extenso para confirmar esta hipótesis e identificar el mecanismo de acción del SHAL. Los resultados proporcionan pruebas convincentes de que los SHAL ofrecen un extraordinario potencial como nanomoléculas novedosas para focalizar al linfoma y la leucemia para la terapia molecular. Los SHAL representan una alternativa atractiva a sus homólogos biológicos, porque estos químicos son unas 50 veces más pequeños, menos caros, más fáciles de producir con uniformidad y estables, y se prevé que tengan una vida útil media prolongada y que resulten efectivos cuando se administran oralmente. Por otra parte, los terapéuticos basados en SHAL pueden transportar y residualizar otros agentes cerca de puntos críticos en el interior de estas células malignas. La plataforma de producción de SHAL es eficiente y flexible y permite la síntesis rápida y modificaciones.

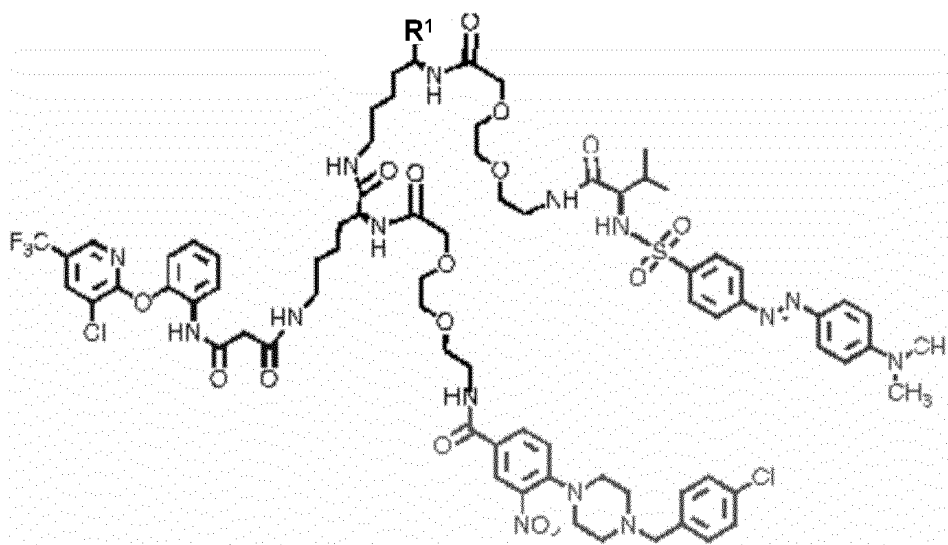
REIVINDICACIONES

1. Un ligando de alta afinidad selectivo (SHAL) que se une específicamente a una célula cancerígena, donde dicho SHAL comprende:

- 5 un primer ligando, un segundo ligando y un tercer ligando unidos entre sí por un enlazador, donde el enlazador comprende polietilenglicol o comprende polietilenglicol y una lisina; el primer ligando comprende ácido 3-(2-{ [3- cloro-5-(trifluorometil)-2- piridinil]oxi}anilino)-3-oxopropanoico (Ct); y
- 10 el segundo ligando comprende ácido 4-[4-(4-clorobencil)piperazino]-3- nitrobenencarboxílico (Cb); y el tercer ligando comprende 4-(Dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonil-L-valina (Dv).

2. El SHAL de la reivindicación 1 donde dicho primer ligando y dicho segundo ligando se unen a puntos en un epítipo reconocido por el anticuerpo Lym-1.

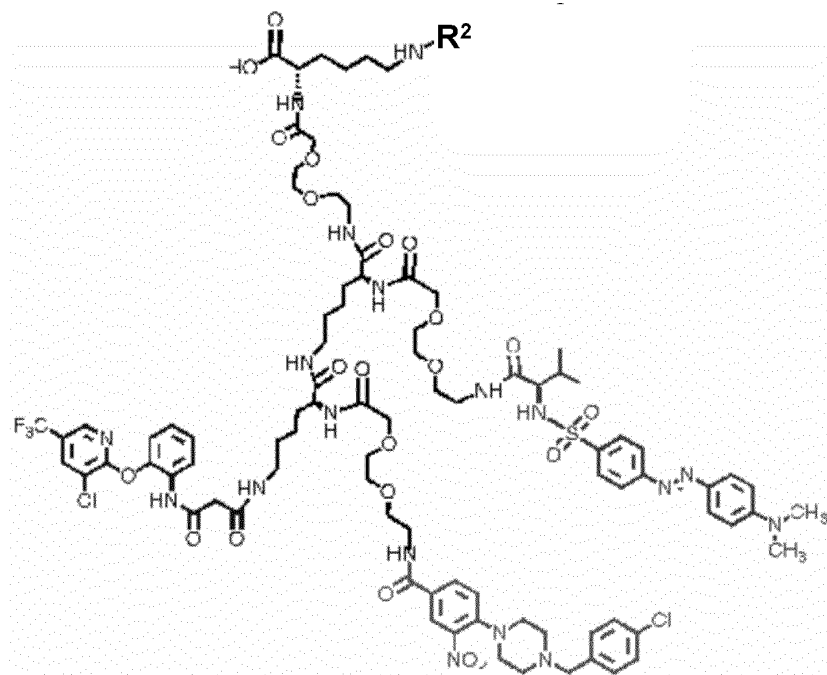
3. El SHAL de la reivindicación 1 donde dicho SHAL comprende la estructura siguiente:



15

donde R¹ es seleccionado del grupo compuesto por COOH, un enlazador, un efector, y un enlazador unido a un efector.

4. El SHAL de la reivindicación 1 donde dicho SHAL comprende la estructura siguiente:



donde R² comprende un efector.

5.El SHAL según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde dicho SHAL está unido a un péptido de transducción.

6.El SHAL de la reivindicación 5, donde dicho péptido de transducción se selecciona del grupo compuesto por hexa-arginina, señal de localización nuclear de SV40, el dominio de transducción de proteína de la proteína Tat del VIH, el péptido de unión a integrina (péptido RGD), el dominio de unión a heparina de vitronectina (péptido VN), la proteína antenapedia de *Drosophila*, VP22, oligoarginina, poli-L-lisina lactosilada u otro oligocación, S-G-E-H-T-N-G-P-S-K-T-S-V-R-W-V-W-D, S-M-T-T-M-E-F-G-H-S-M-I-T-P-Y-K-I-D, Q-D-G-G-T-W-H-L-V-A-Y-C-A-K-S-H-R-Y, M-S-D-P-N-M-N-P-G-T-L-G-S-S-H-I-L-W, S-P-G-N-Q-S-T-G-V-I-G-T-P-S-F-S-N-H, S-S-G-A-N-Y-F-F-N-A-I-Y-D-F-L-S-N-F, y G-T-S-R-A-N-S-Y-D-N-L-L-S-E-T-L-T-Q.

7.El SHAL según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde dicho SHAL se une a un efector, donde dicho efector se selecciona del grupo compuesto por un marcador de epítipo, un anticuerpo, un segundo SHAL, una etiqueta, una citotoxina, un liposoma, un radionúclido, un fármaco, un profármaco, un inhibidor de enzima, una partícula viral, una citoquina, un quelato, particularmente donde el efector es (i) una citotoxina seleccionada del grupo compuesto por una toxina de difteria, una exotoxina de *Pseudomonas*, una ricina, una abrina y una timidina quinasa, (ii) un quelato que comprende un isótopo metálico seleccionado del grupo compuesto por ⁹⁹Tc, ²⁰³Pb, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ¹¹¹In, ^{113m}In, ⁹⁷Ru, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁵²Fe, ^{52m}Mn, ⁵¹Cr, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁷⁷As, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁹Er, ¹²¹Sn, ¹²⁷Te, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ¹⁶¹Tb, ¹⁰⁹Pd, ¹⁶⁵Dy, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵¹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁷Gd, ¹⁵⁹Gd, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷²Tm, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁰⁵Rh, y ¹¹¹Ag, (iii) un quelato que comprende un emisor alfa, (v) un quelato que comprende DOTA, (vi) un lípido o un liposoma, o (vii) seleccionado del grupo compuesto por ácido 3-(2-[(3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinil]oxi)-anilino)-3-oxopropanoico (Ct), 4[[5-(Trifluorometil)piridin-2-il]oxi]fenil]N-fenilcarbarnato, ácido (R)-2-[4-(5-cloro-3-fluoro-2-piridiloxi)fenoxi]propiónico, 2-(((3-cloro-5(trifluorometil)piridin-2- iloxi)fenoxi)metil)acrilatos, 2-(((3-cloro- 5(trifluorometil)piridin-2- iloxi)fenil)metil)acrilatos, 2-(((3-cloro- 5(trifluorometil)piridin-2- iloxi)fenil)metil)acrilonitrilos, ácido 3-(3-cloro-4- [(5- (trifluorometil)-2- piridinil]oxi)anilino)-3-oxopropanoico, Sethoxydim, Clethodim, ácido 5- (Tetradeciloxi)-2- furoico, ácido 2-[(2,6-diclorofenil)amino]bencenoacético, ácido 2-[4-(4- clorofenoxi)fenoxi]propanoico, ácido (RS)-2- {4-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2- piridinil]oxi]fenoxi}propanoico, ácido (RS)-2-[4-(6-cloro-1,3-benzoxazol-2- iloxi)fenoxi]propanoico, ácido (RS)-2-[4-(2,4-diclorofenoxi)fenoxi]propanoico, ácido (RS)-2-[4-[5- (trifluorometil)-2- piridiloxi]fenoxi]propanoico, ácido (RS)-2-[4-(6- cloroquinoxalin-2- iloxi)fenoxi]propanoico, y ácido (RS)-2-[4-(α, α, α-trifluoro-p- toliloxi)fenoxi]propanoico.

8.Un ligando de alta afinidad selectivo (SHAL) polidentado según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en un método de inhibición del crecimiento o la proliferación de una célula cancerígena que expresa un marcador del HLA-DR10, donde dicho método comprende: poner en contacto dicha célula cancerígena con el ligando de alta afinidad selectivo (SHAL) polidentado.

9.Un método *in vitro* para detectar una célula cancerígena, donde dicho método comprende:

el contacto de una célula cancerígena con una molécula quimérica que comprende un SHAL según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 unido a un marcador de epítipo;

el contacto de dicha molécula quimérica con un quelato que comprende una fracción detectable por la que dicho quelato se une a dicho marcador de epítipo, asociando así dicha fracción detectable con dicho quelato; y

detectar dicha fracción detectable.

10. El método de la reivindicación 9, donde dicha fracción detectable comprende (i) un radionúclido, (ii) una fracción detectable seleccionada del grupo compuesto por un emisor gamma, un emisor de positrones, un emisor alfa, un emisor de rayos X y un emisor de fluorescencia; o (iii) un isótopo metálico seleccionado del grupo compuesto por ⁹⁹Tc, ²⁰³Pb, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ¹¹¹In, ^{113m}In, ⁹⁷Ru, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁵²Fe, ^{52m}Mn, ⁵¹Cr, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁷⁷As, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁹Er, ¹²¹Sn, ¹²⁷Te, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ¹⁶¹Tb, ¹⁰⁹Pd, ¹⁶⁵Dy, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵¹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁷Gd, ¹⁵⁹Gd, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷²Tm, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁰⁵Rh, y ¹¹¹Ag.

11. Una molécula quimérica que comprende un SHAL según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 unido a un marcador de epítipo para el uso en un método de detección de una célula cancerígena, donde dicho método comprende: el contacto de una célula cancerígena con una molécula quimérica que comprende un SHAL según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 unido a un marcador de epítipo; el contacto de dicha molécula quimérica con un quelato que comprende una fracción detectable por la que dicho quelato se une a dicho marcador de epítipo, asociando así dicha fracción detectable con dicho quelato; y detectar dicha fracción detectable.

12. La molécula para el uso de la reivindicación 11, donde dicha fracción detectable comprende (i) un radionúclido, (ii) una fracción detectable seleccionada del grupo compuesto por un emisor gamma, un emisor de positrones, un emisor alfa, un emisor de rayos X y un emisor de fluorescencia; o (iii) un isótopo metálico seleccionado del grupo compuesto por ⁹⁹Tc, ²⁰³Pb, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ¹¹¹In, ^{113m}In, ⁹⁷Ru, ⁶²Cu,

ES 2 613 844 T3

⁶⁴Cu, ⁵²Fe, ^{52m}Mn, ⁵¹Cr, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁷⁷As, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁹Er, ¹²¹Sn, ¹²⁷Te, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ¹⁶¹Tb,
¹⁰⁹Pd, ¹⁶⁵Dy, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵¹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁷Gd, ¹⁵⁹Gd, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷²Tm, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag.

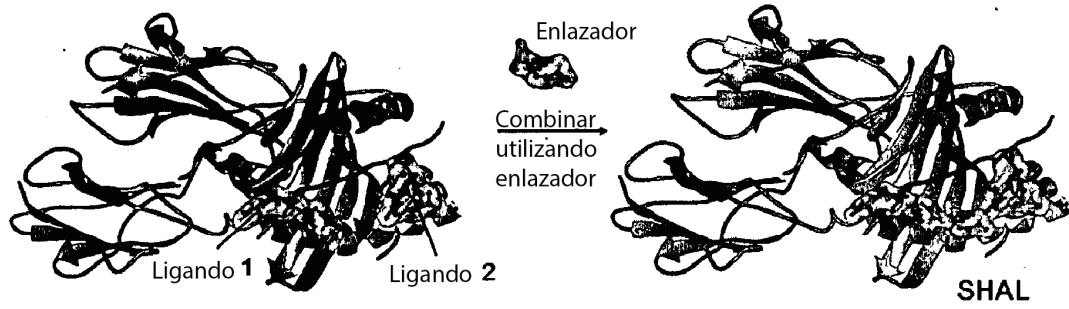


Fig. 1

Arrays tisulares: la Técnica

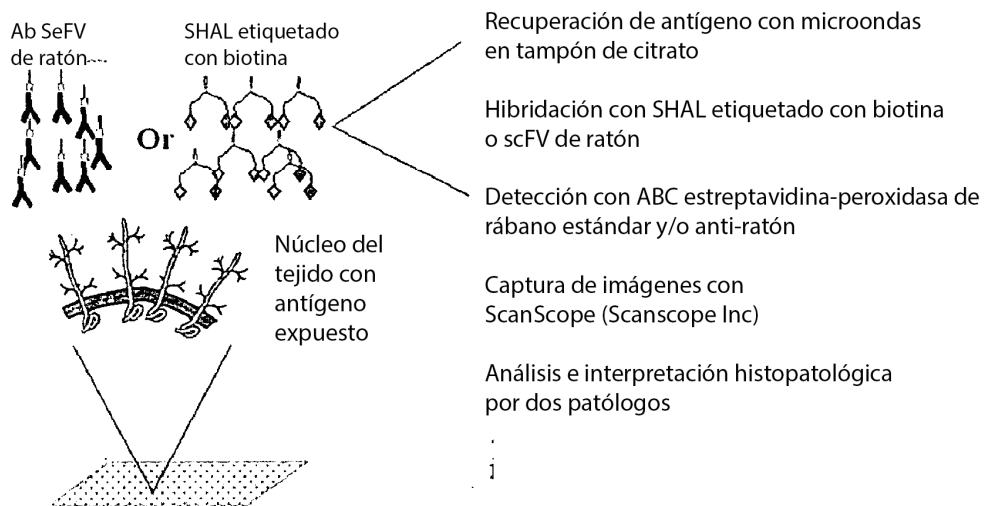


Fig. 2

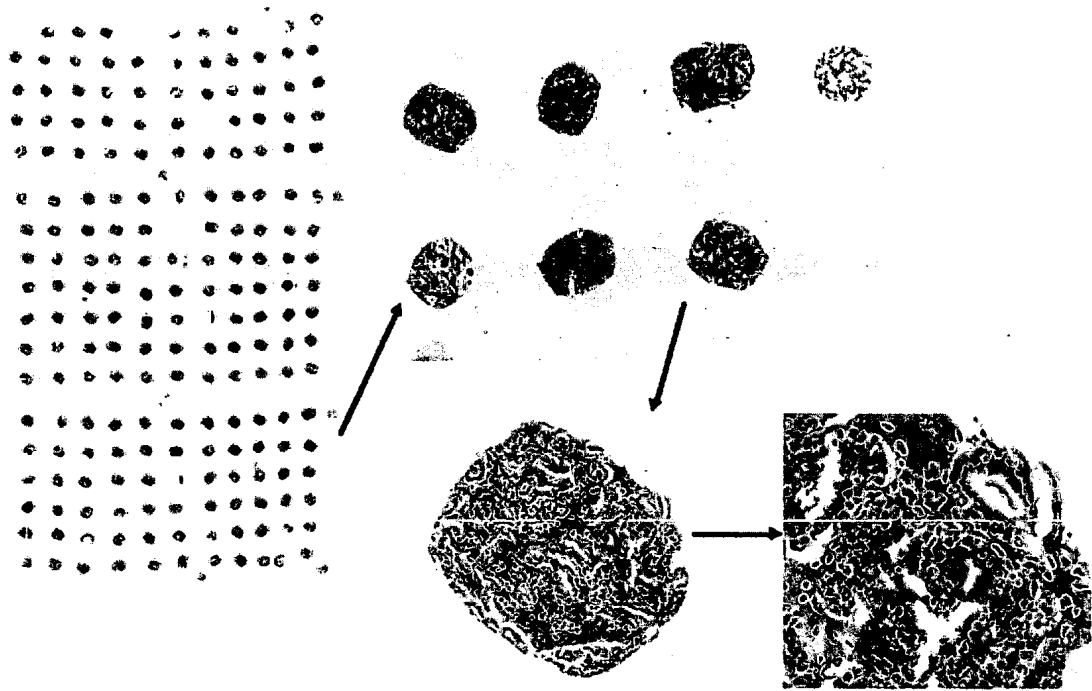


Fig. 3

Normal MUC1

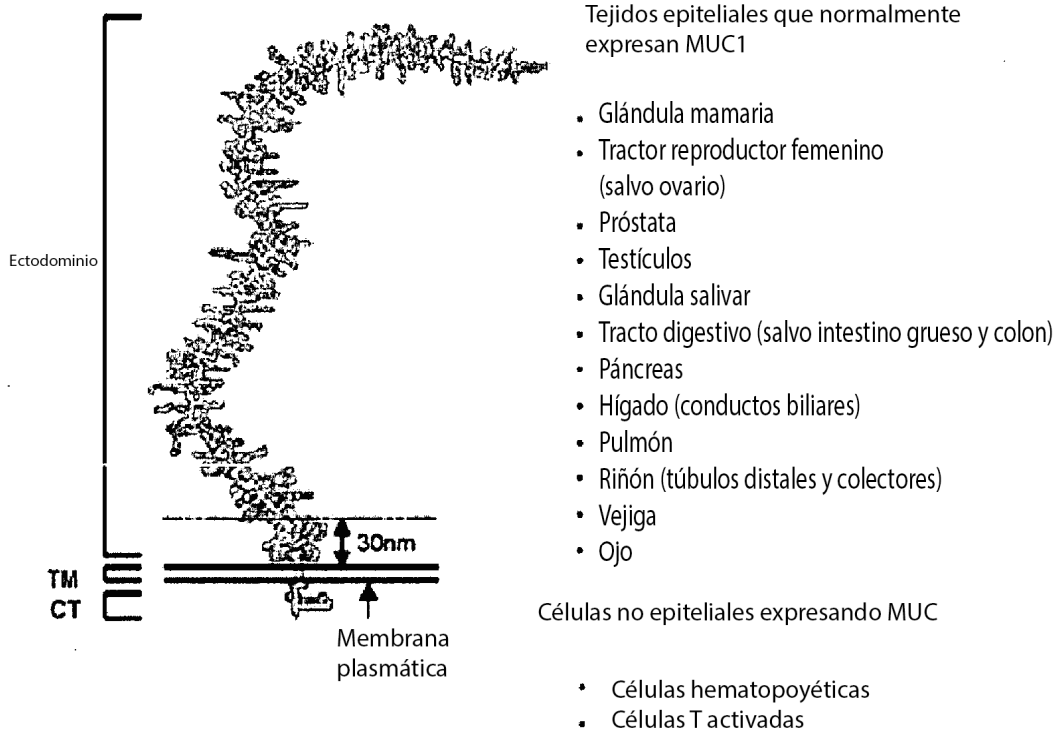


Fig. 4A

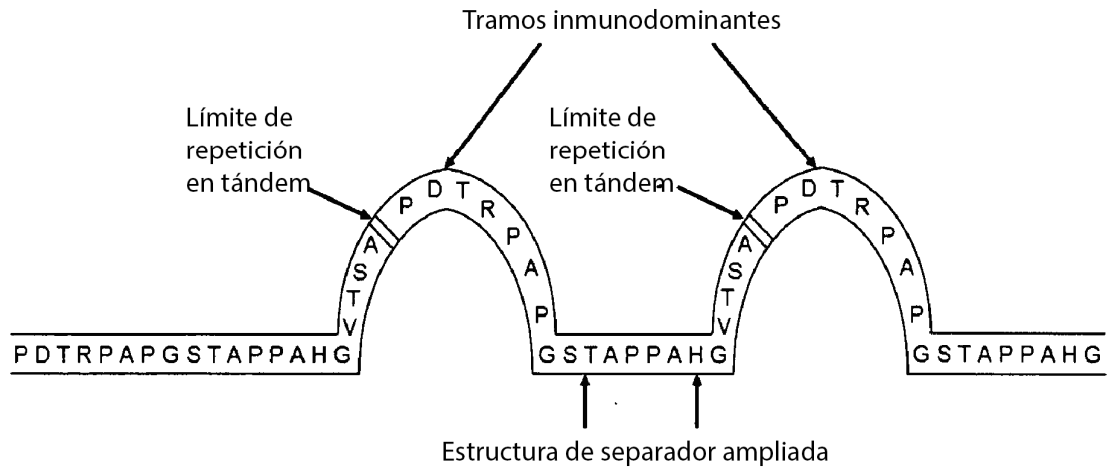


Fig. 4B

Núcleos de tejido prostático de grado Gleason:

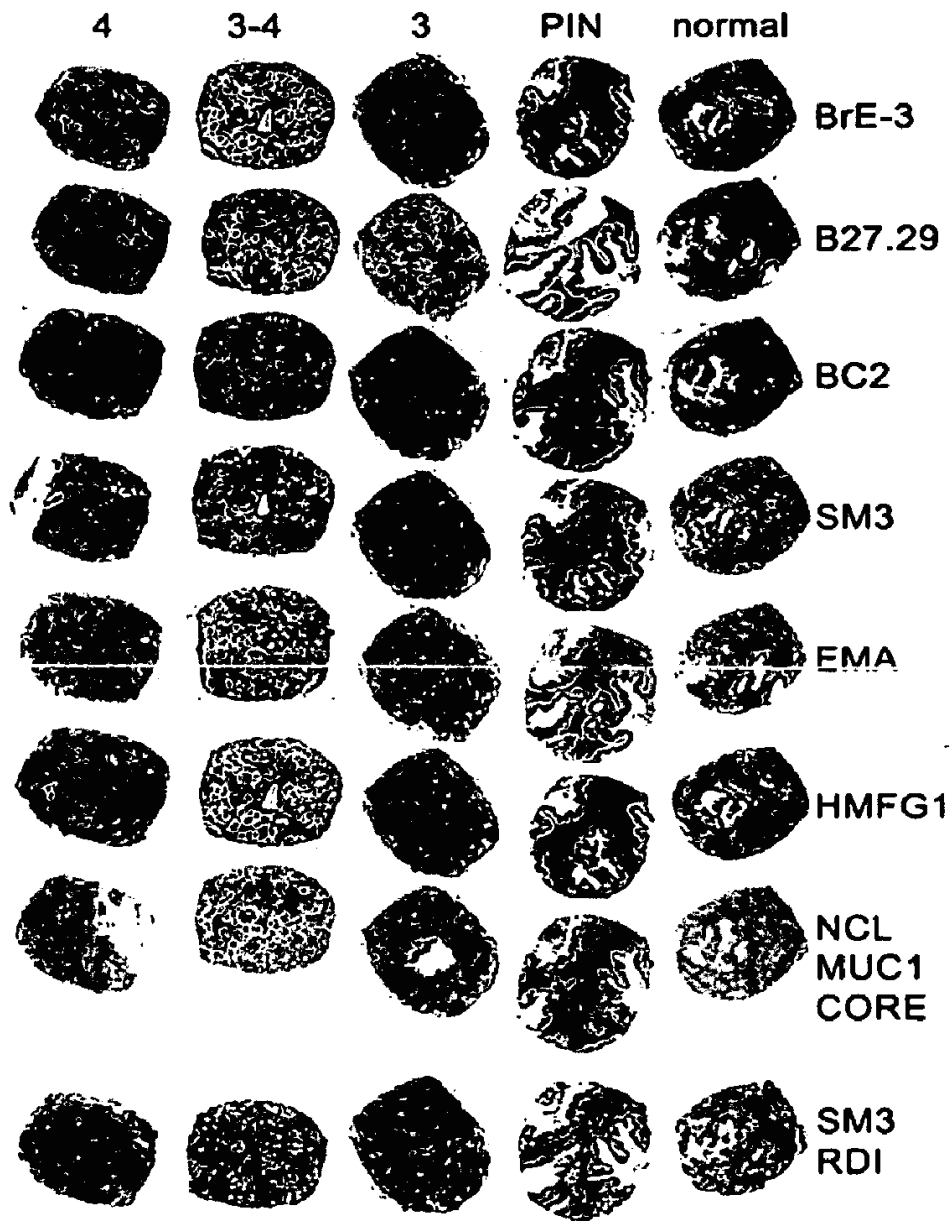


Fig. 5

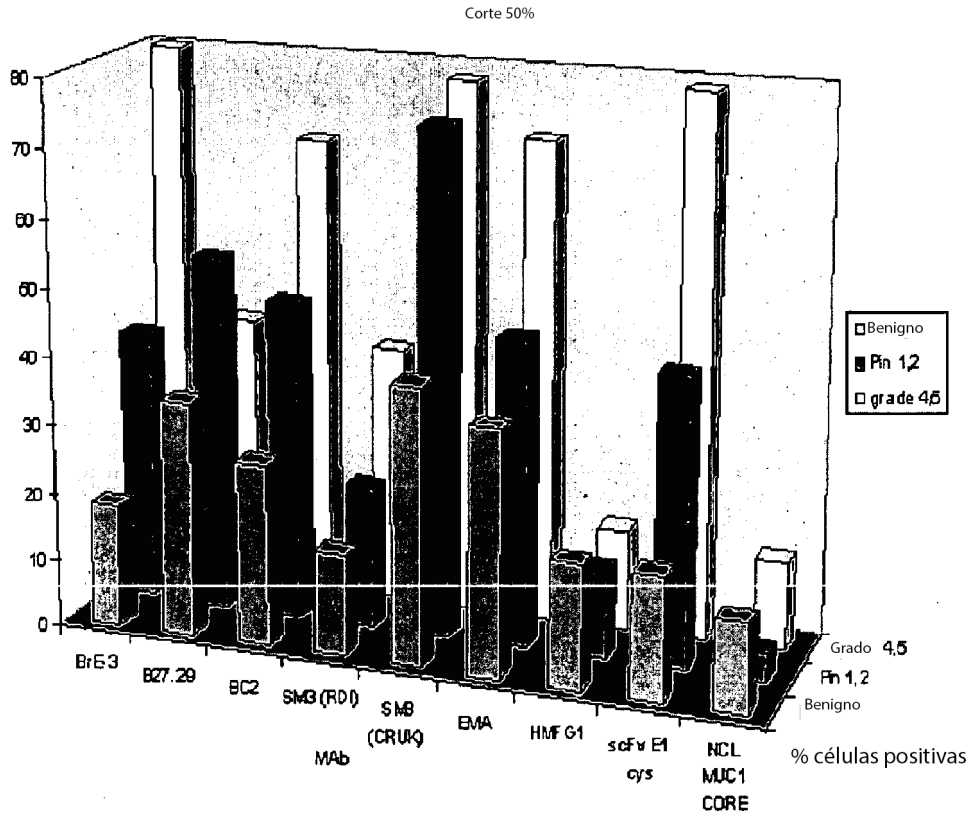


Fig. 6

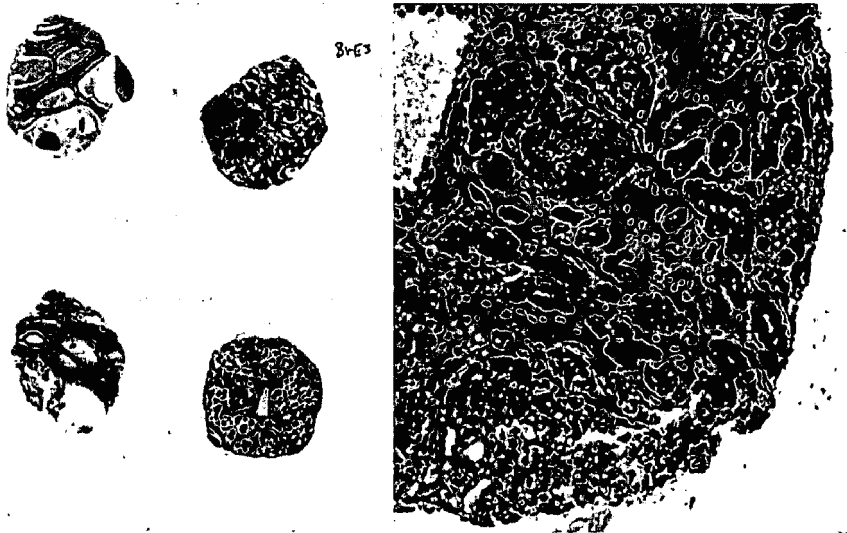


Fig. 7

```

* ** . *****:****:*** * *
hla_dr10 -----GDTRPRFLEEVKFECHFFNGTERVLLER
laqd_B -----GDTRPRFLWOLKFECHFFNGTERVLLERC
ld5m_B -----GDTRPRFLEOVKHECHFFNGTERVFLDRY
lbx2_B -----TRPRFLWQPKRECHFFNGTERVFLDRY
la6a_B -----PRFLEYSTSECHFFNGTERVFLDRY
li3r_B RDSRGKKVITAFNEGLKGGGSLVGGGSGGGGSRPWELEYCKSECHFYNGTQVRVLLVRY

.:. ** *:*****:***** ***** ;:***: *. *. *. ***** : :.*
hla_dr10 VFNQEEYARVDSVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLEARRAAVDTYCRHNTGVGESFT
laqd_B FYNQEEYVRFDSVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLIEQRRAAVDTYCRHNYGVGESFT
ld5m_B FYNQEEYVRFDSVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKRAAVDTYCRHNYGVGESFT
lbx2_B FYNQEEYVRFDSVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLIEQARRAAVDTYCRHNYGVGESFT
la6a_B FYNQEEYVRFDSVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLIEQKRCRVDNYCRHNYGVGESFT
li3r_B TYNQEENVRFDSVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLIEQKRAEVDTYCRHNYEIEFDNFI

* * * * *****:*****:***** .*****.***** **;***:***:*****:;*
hla_dr10 VQRRVQPKVTVYPSKTQPLQHHNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKYGVVSTGLIQN
laqd_B VQRRVEPKVTVYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEERAGVVSTGLIQN
ld5m_B VQRRVYFVTVYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGVVSTGLIQN
lbx2_B VQRRVQPKVTVYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFVNGQEEKAGMVSTGLIQN
la6a_B VQRRVHPKVTVYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGVVSTGLIHN
li3r_B VERRVEPKVTVYPAKTQPLQHHNLLVCSVSDFYPGNIEVRWFRNGQEEKTGLVSTGLVRN

*****:*****:*****: .*:*****:*.
hla_dr10 GDWTFQTLVMLETVPSGGEVYTCQVEHPSVMSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGL
laqd_B GDWTFQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSK-----
ld5m_B GDWTFQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSE-----
lbx2_B GDWTFQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSE-----
la6a_B GDWTFQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRAR-----
li3r_B GDWTFQTLVMLETVPSGGEVYTCQVEHPSLTDPTVVEWKAQSTSAQNK-----

hla_dr10 LFLGAGLFIYFRNQKGHSGLPPTGFLS 237
laqd_B ----- 198
ld5m_B ----- 192
lbx2_B ----- 191
la6a_B ----- 187
li3r_B ----- 228

```

Fig. 8

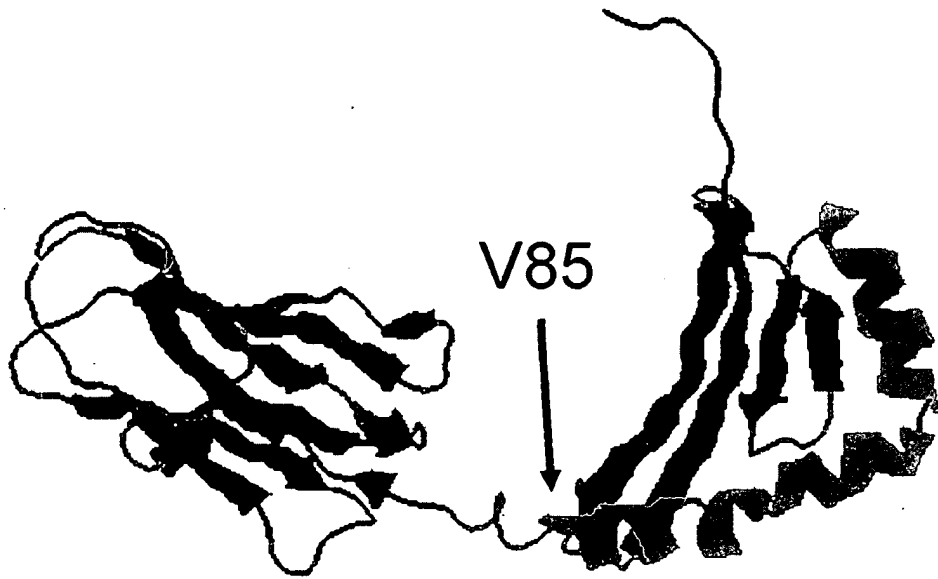


Fig. 9

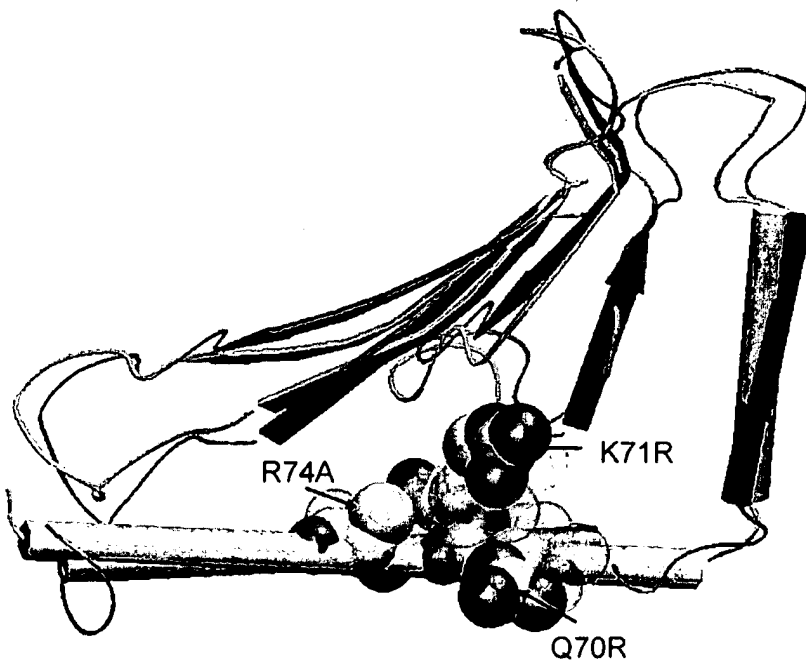


Fig. 10

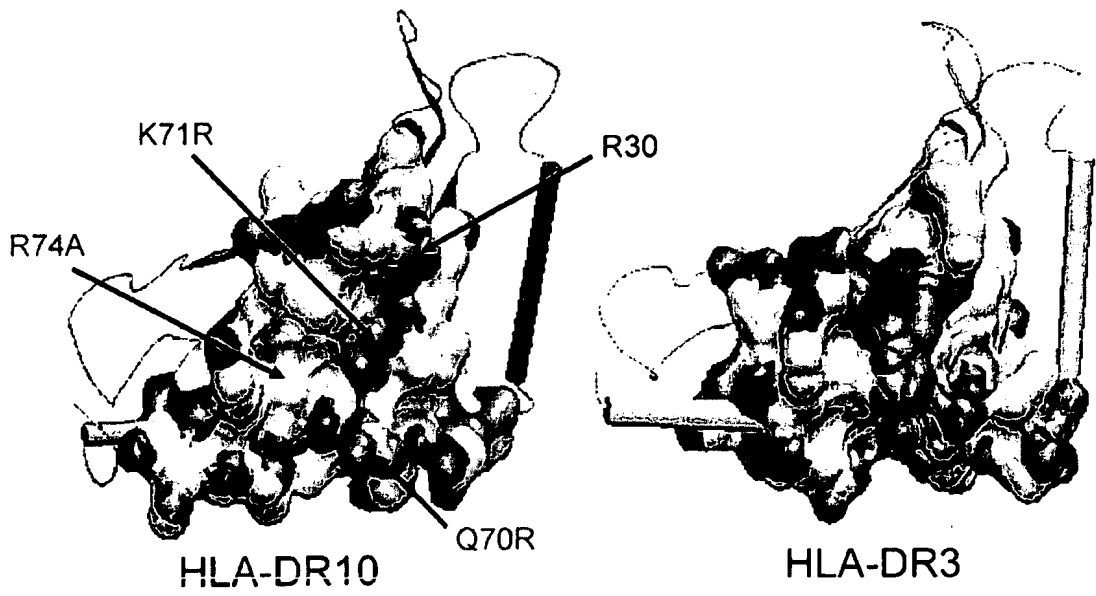


Fig. 11

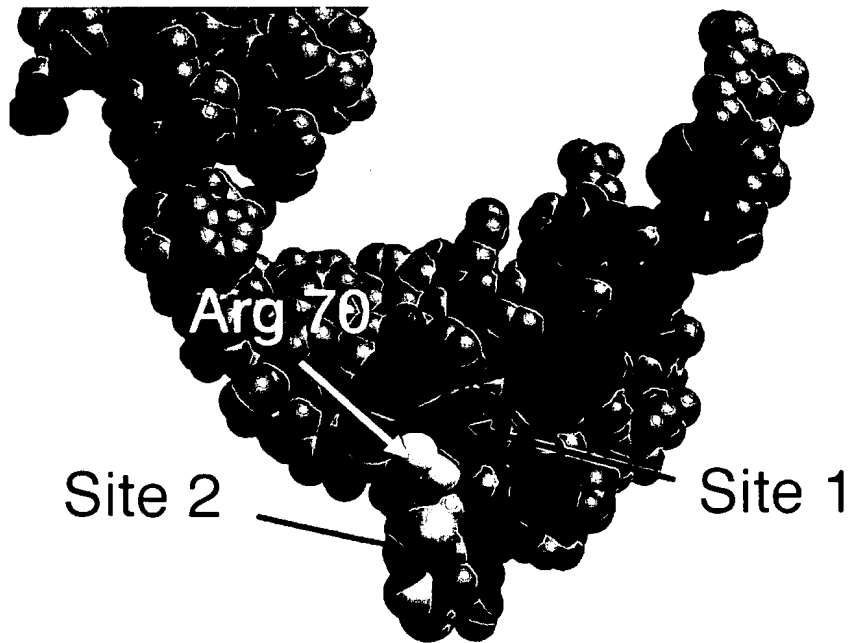


Fig. 12

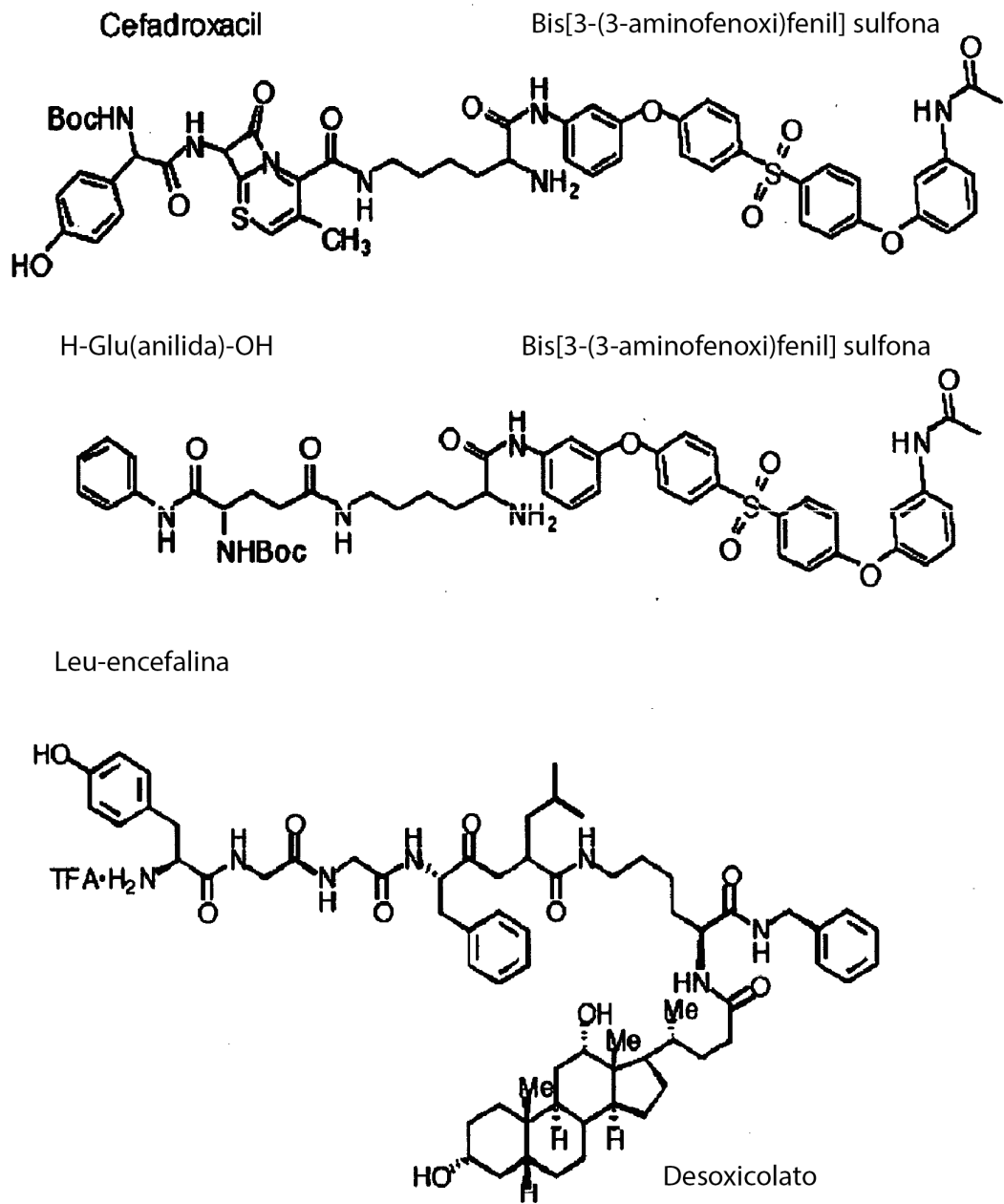
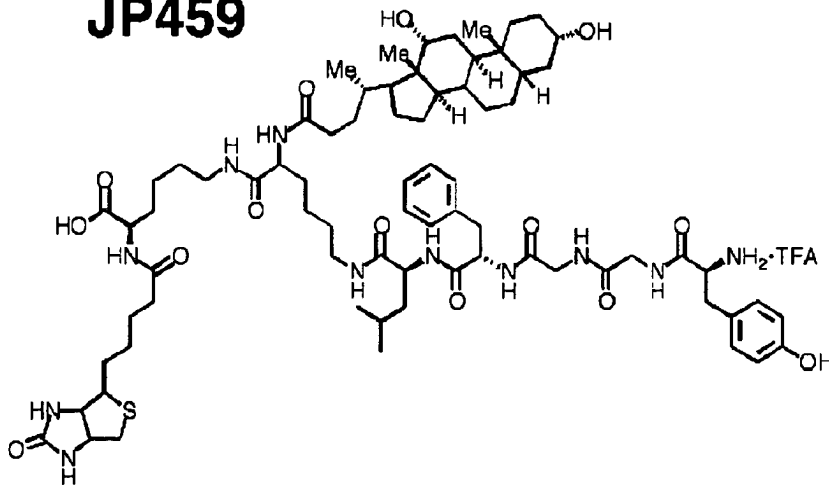


Fig. 13A

JP459



JP459B

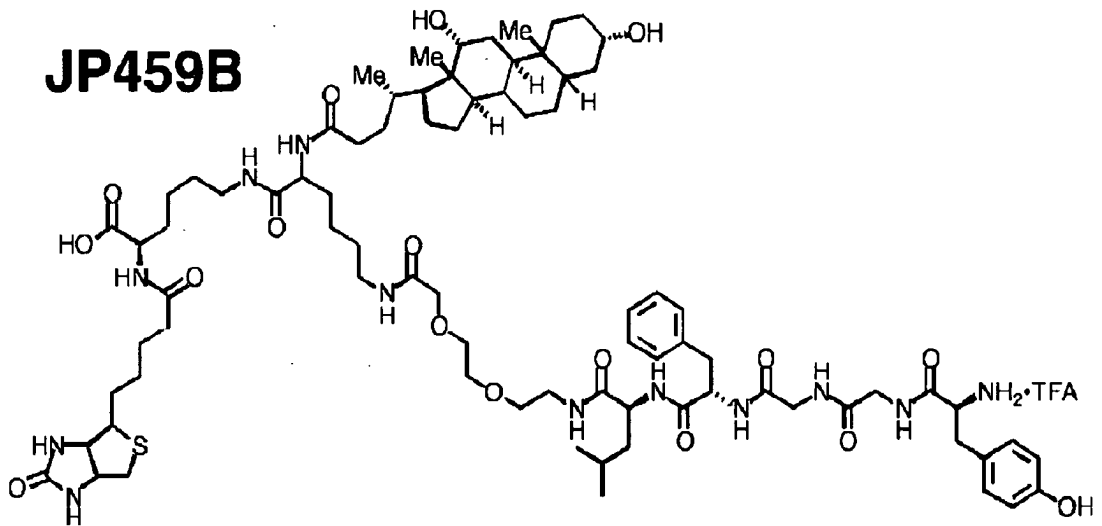


Fig. 13B

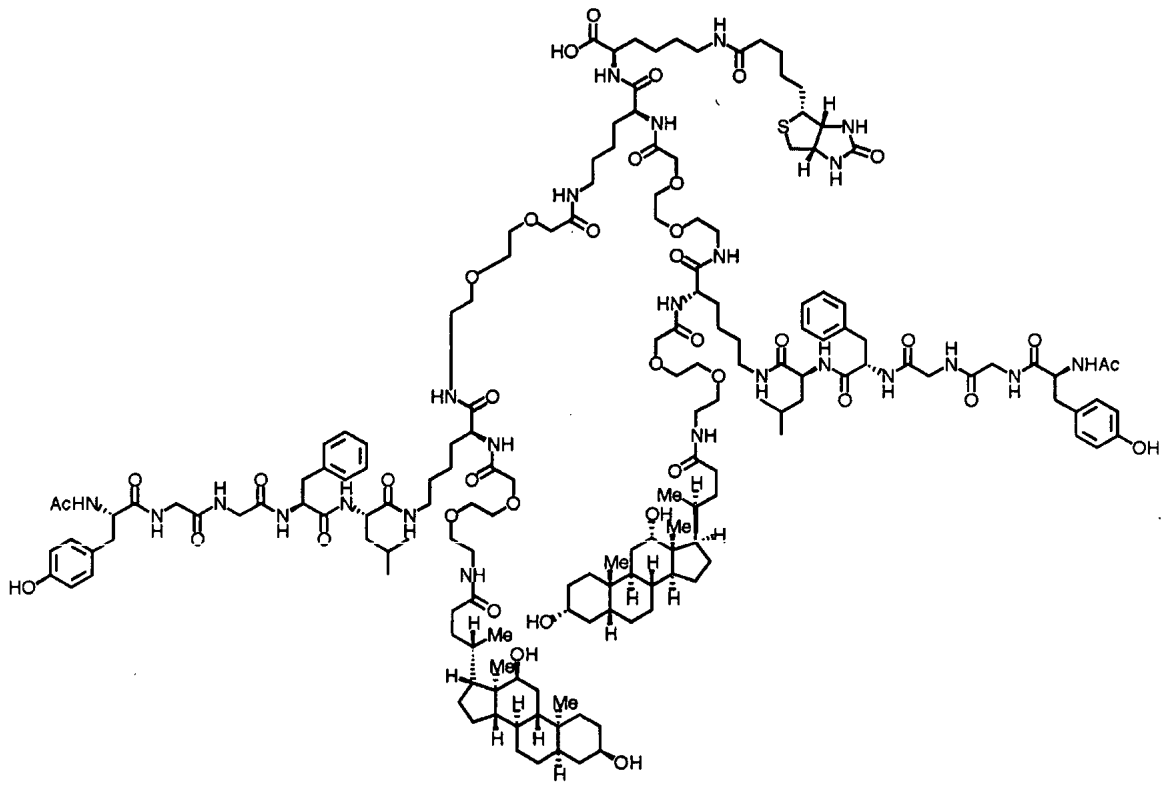


Fig. 14

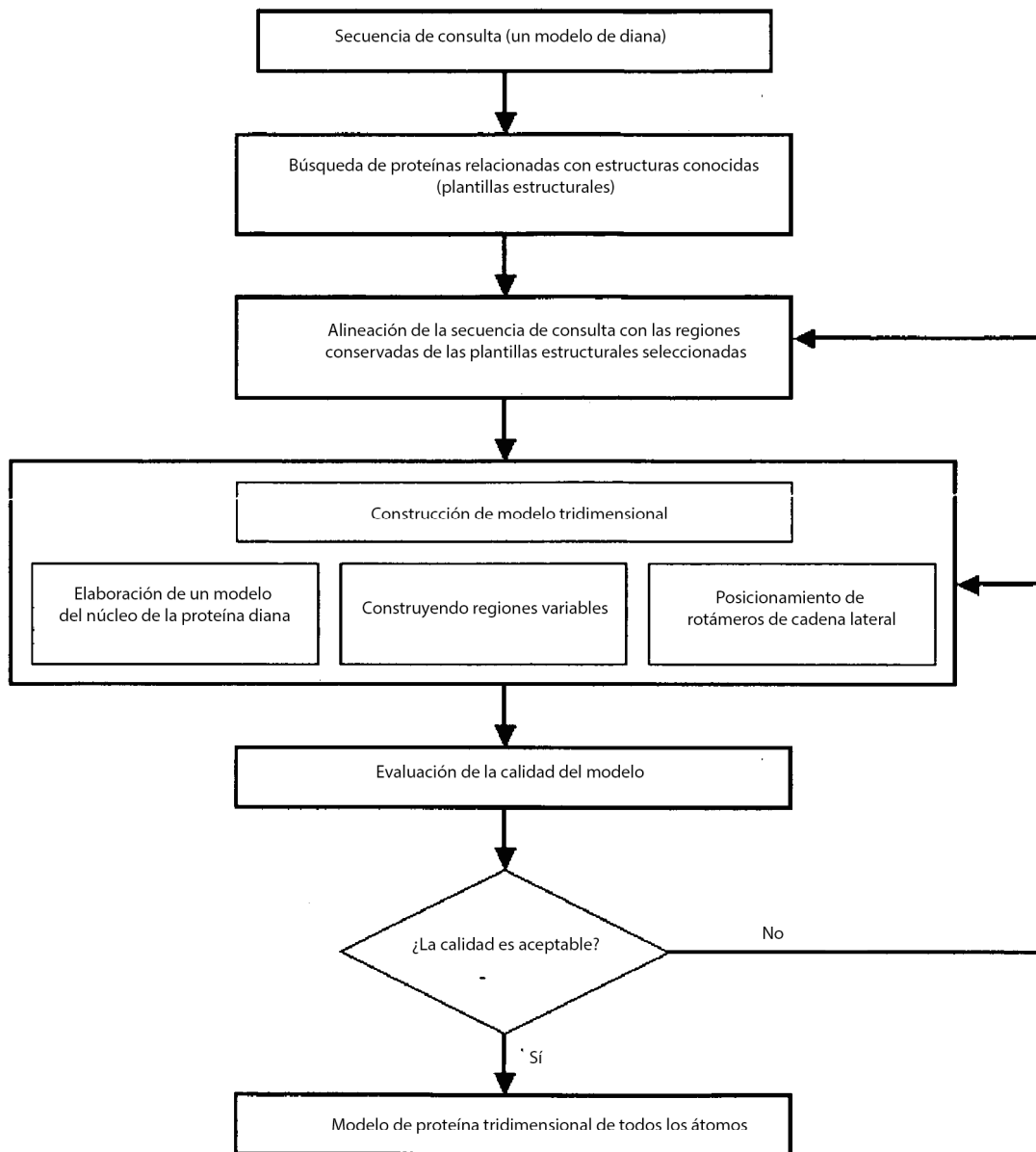


Fig. 15

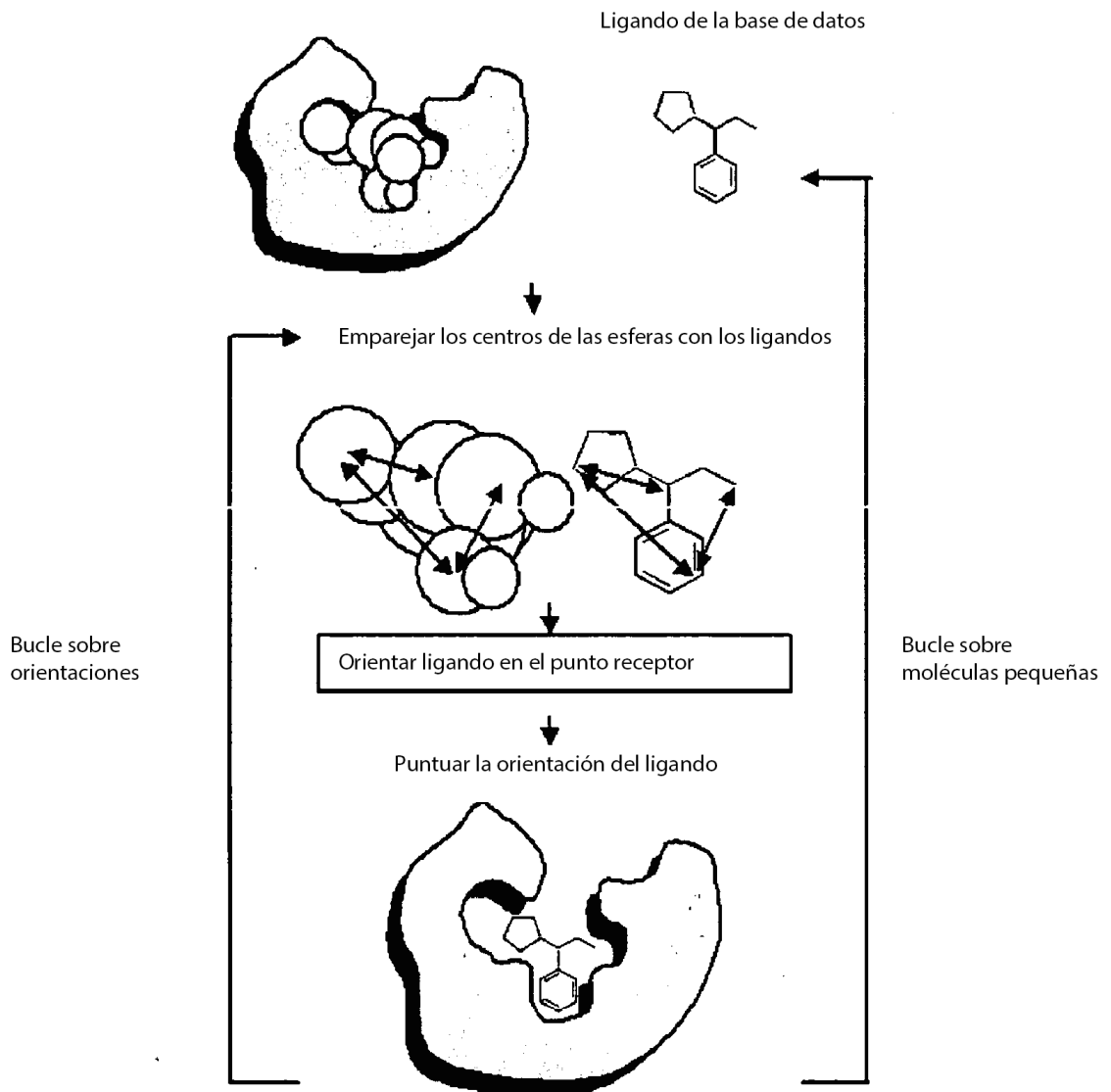


Fig. 16

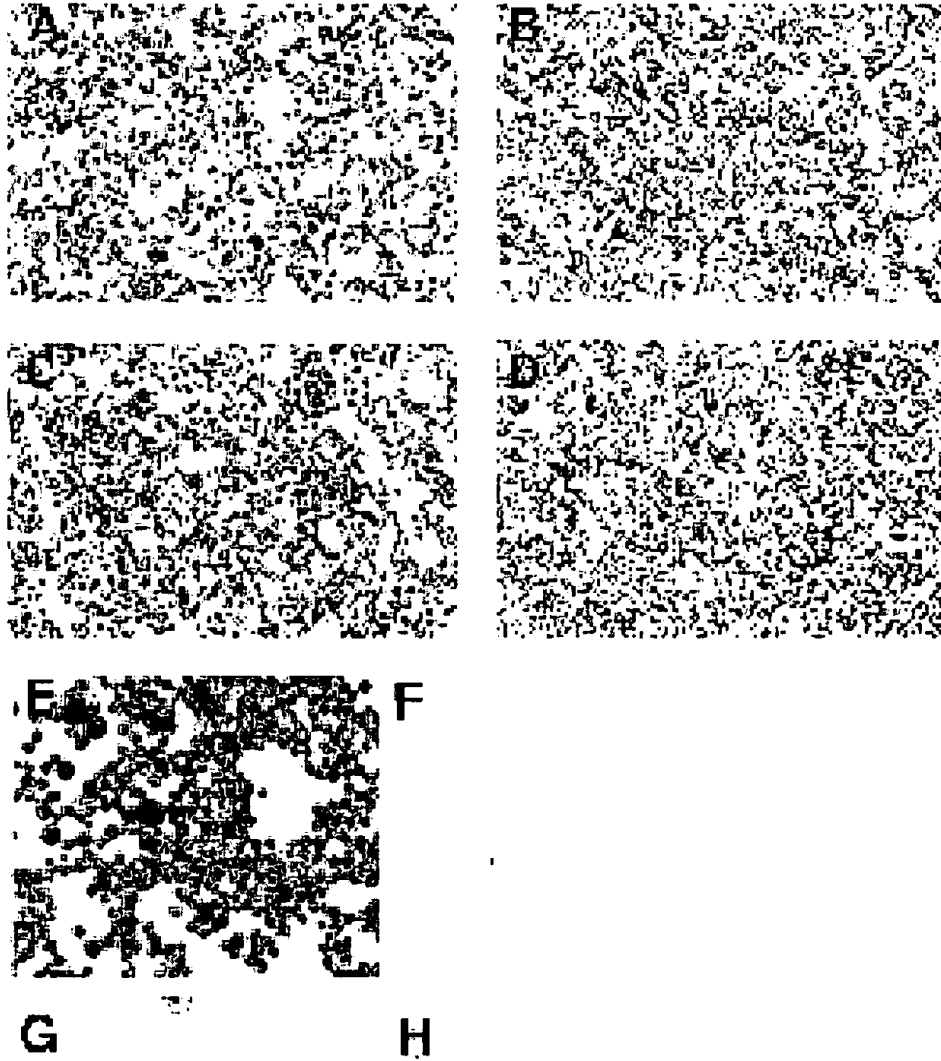


Fig. 17A

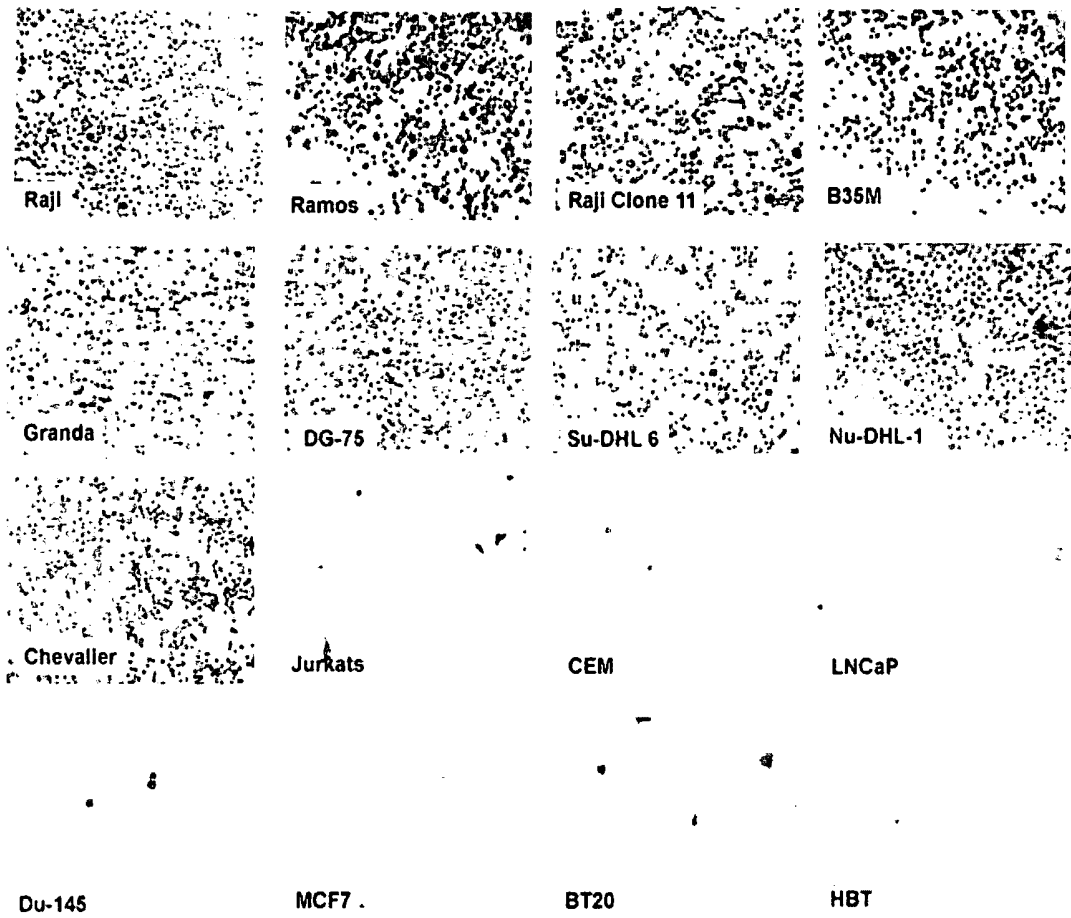


Fig. 17B

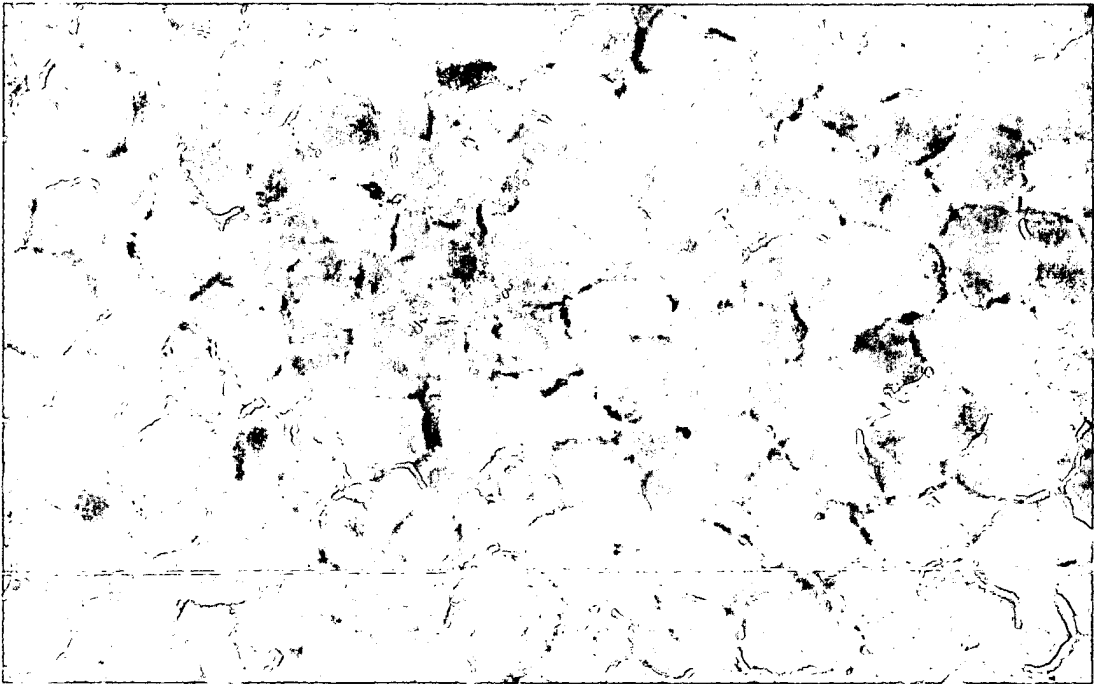


Fig. 18

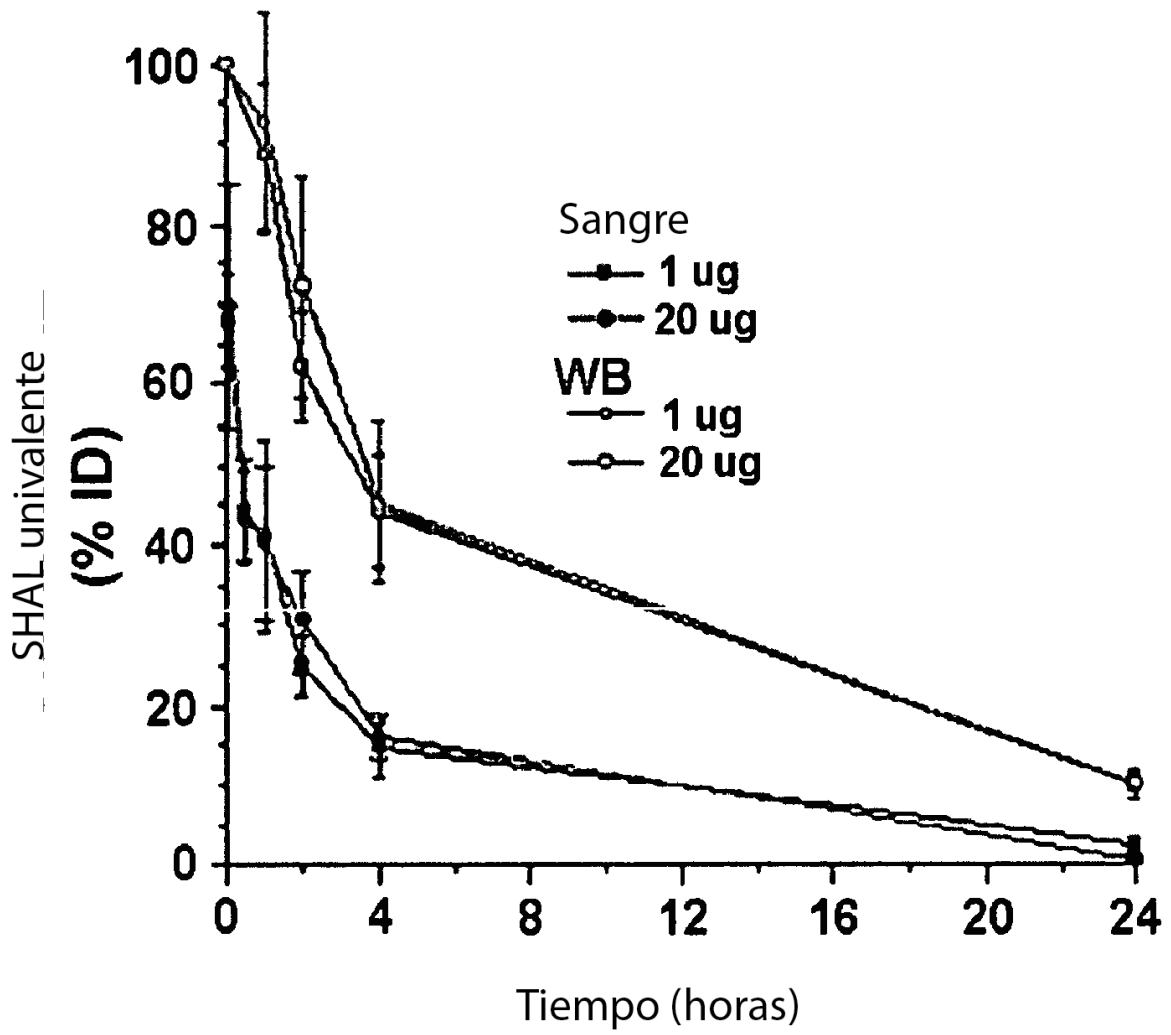


Fig. 19

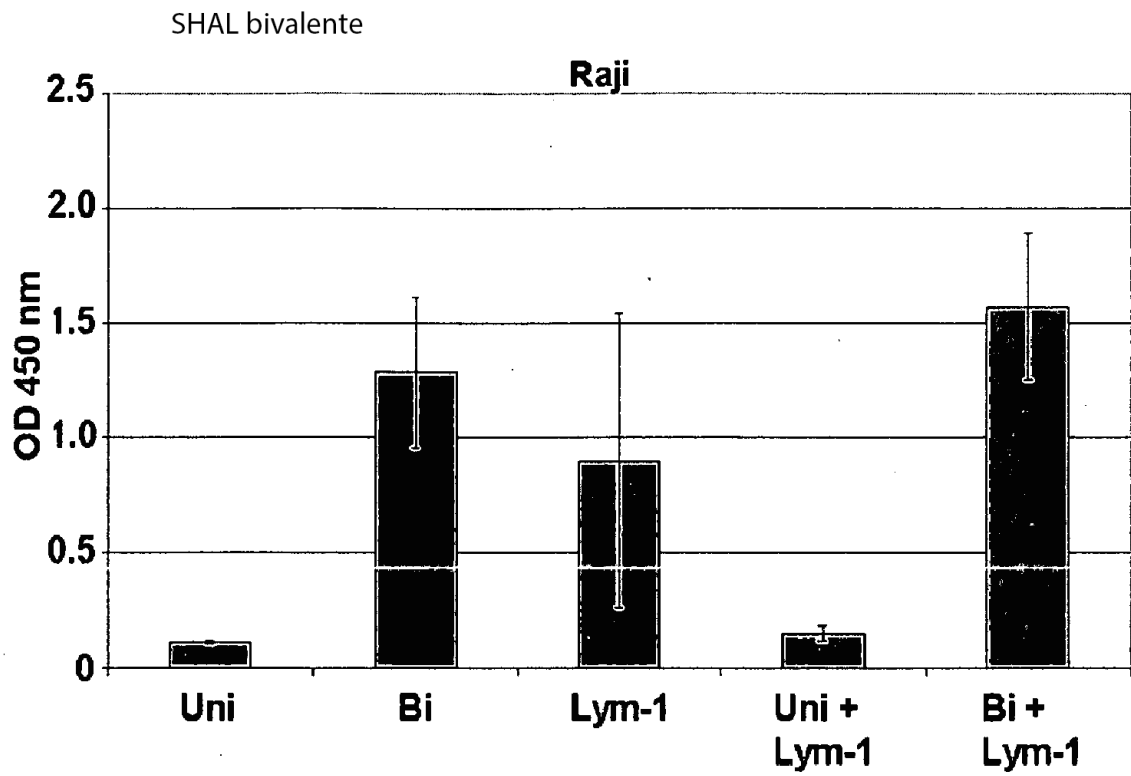


Fig. 20

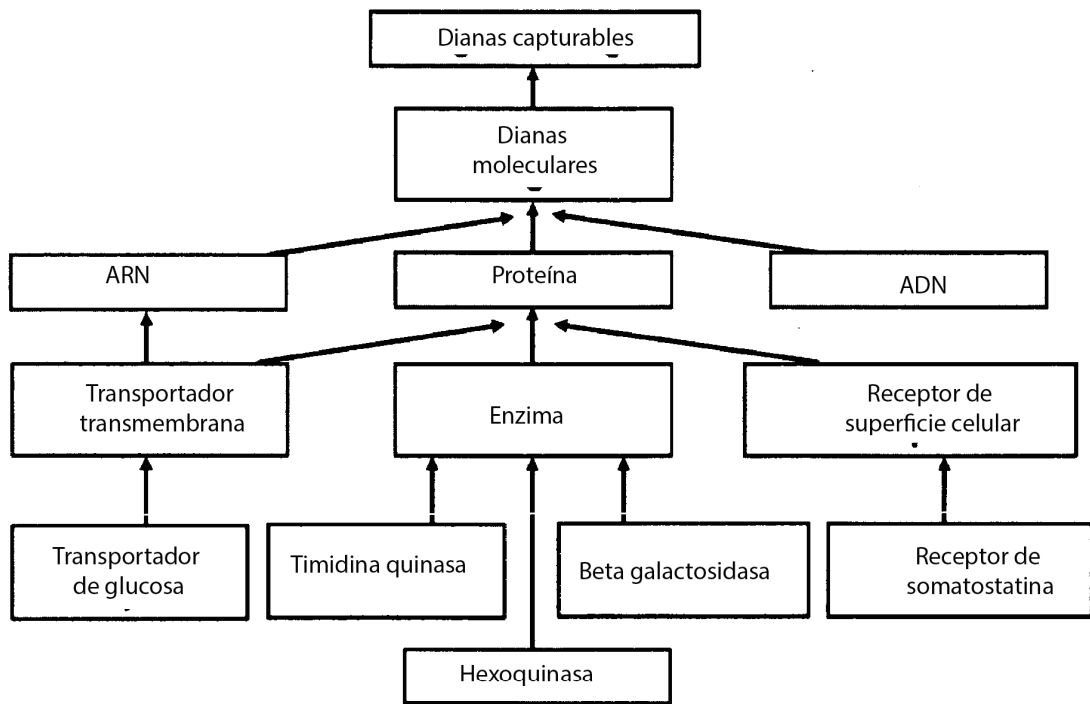


Fig. 21

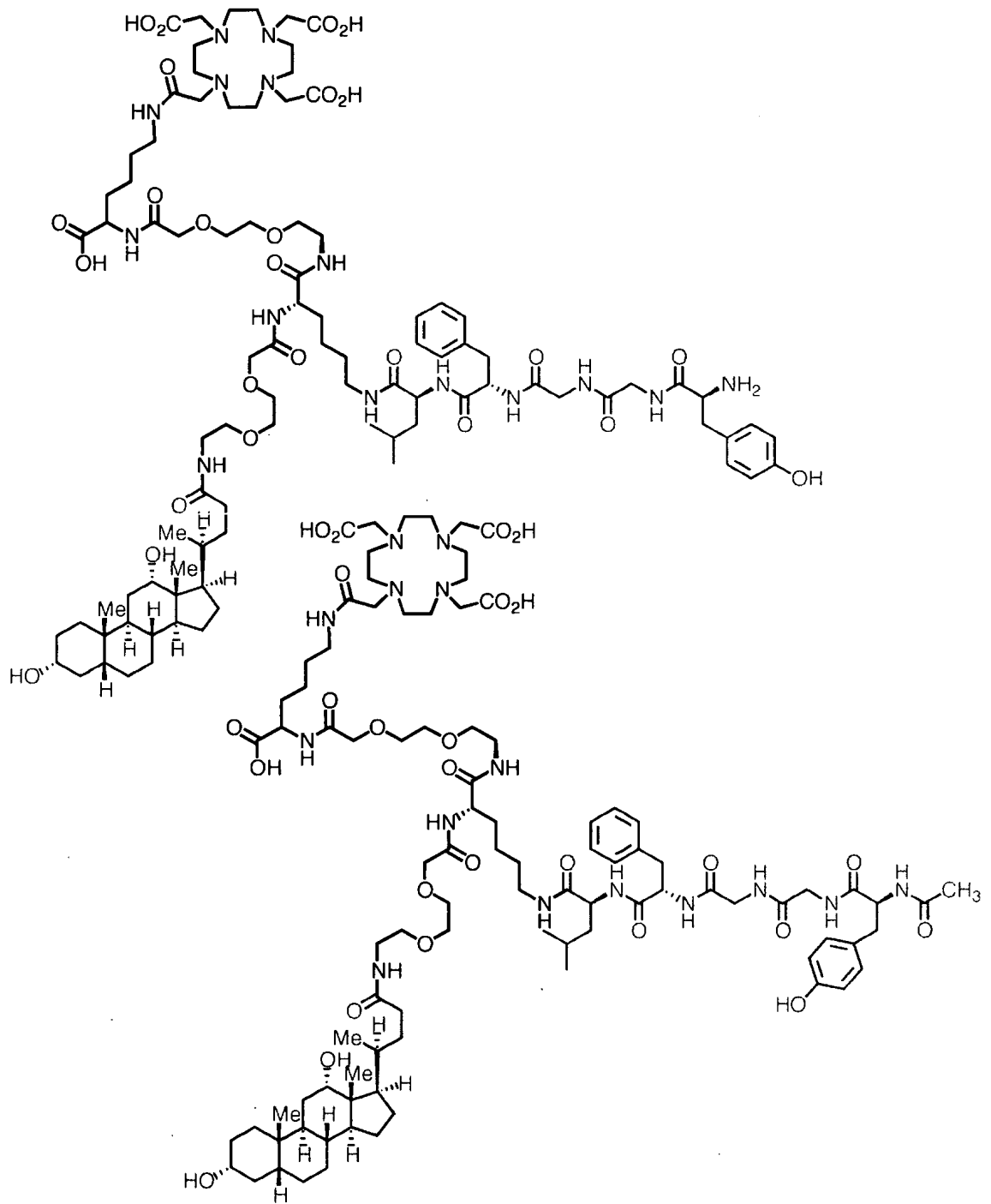


Fig. 22

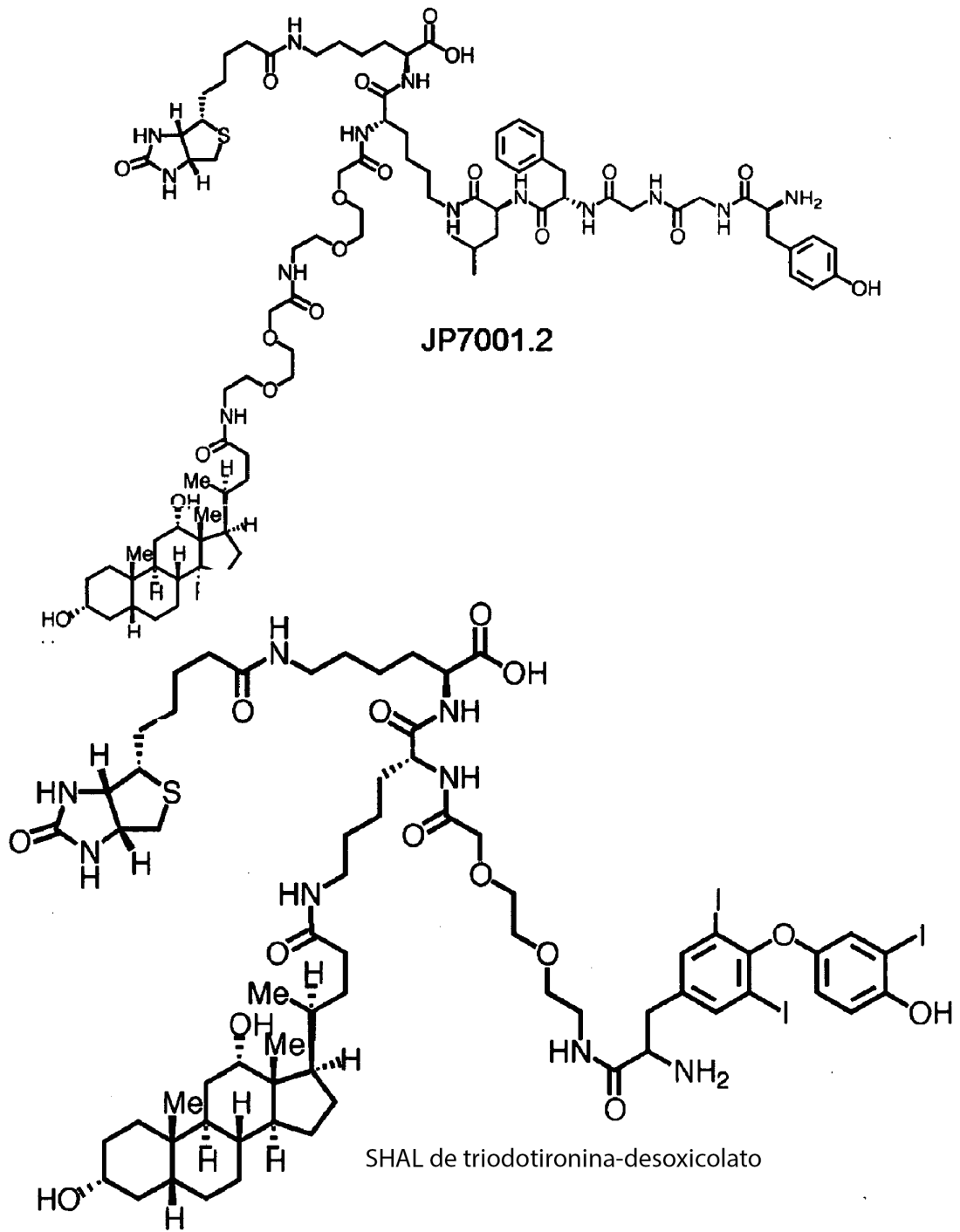


Fig. 23

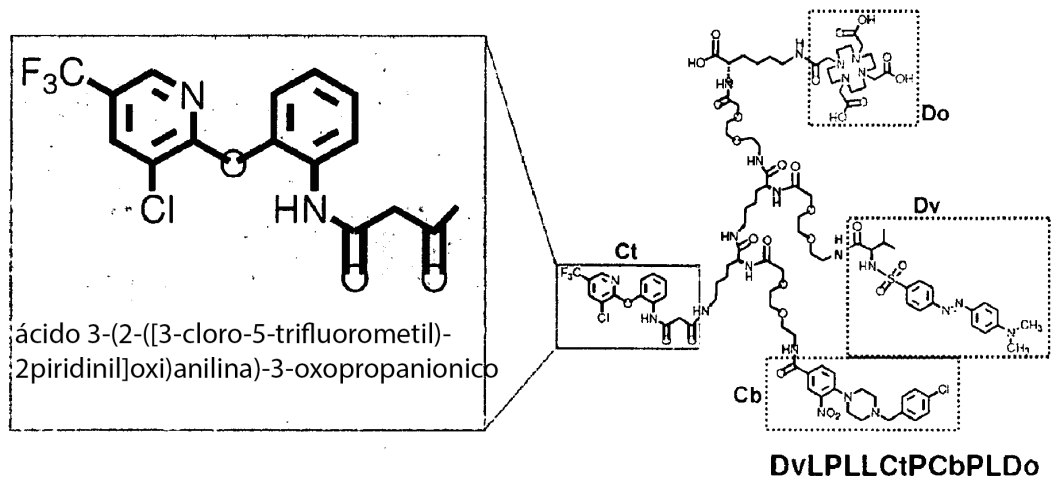


Fig. 24A

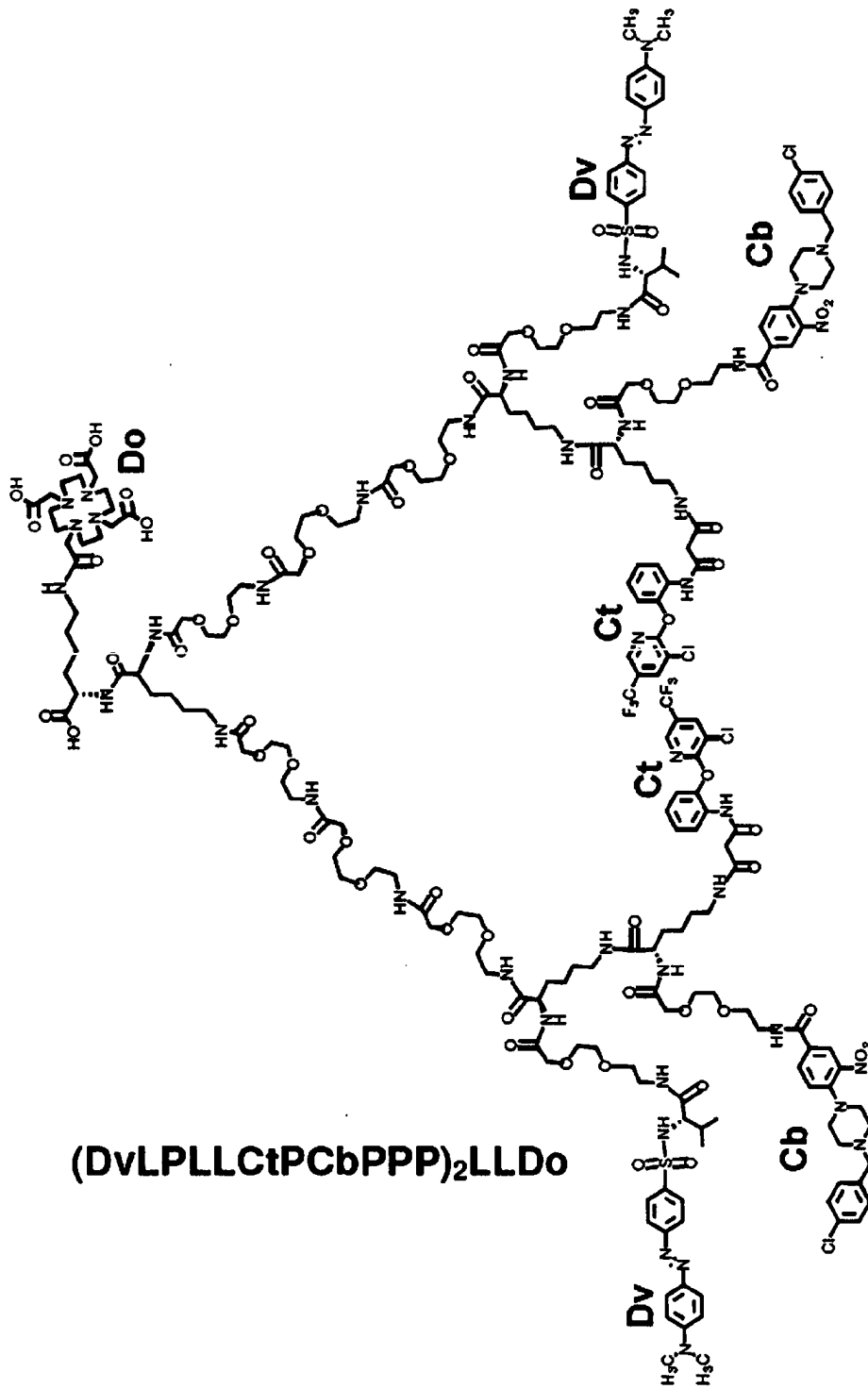


Fig. 24B

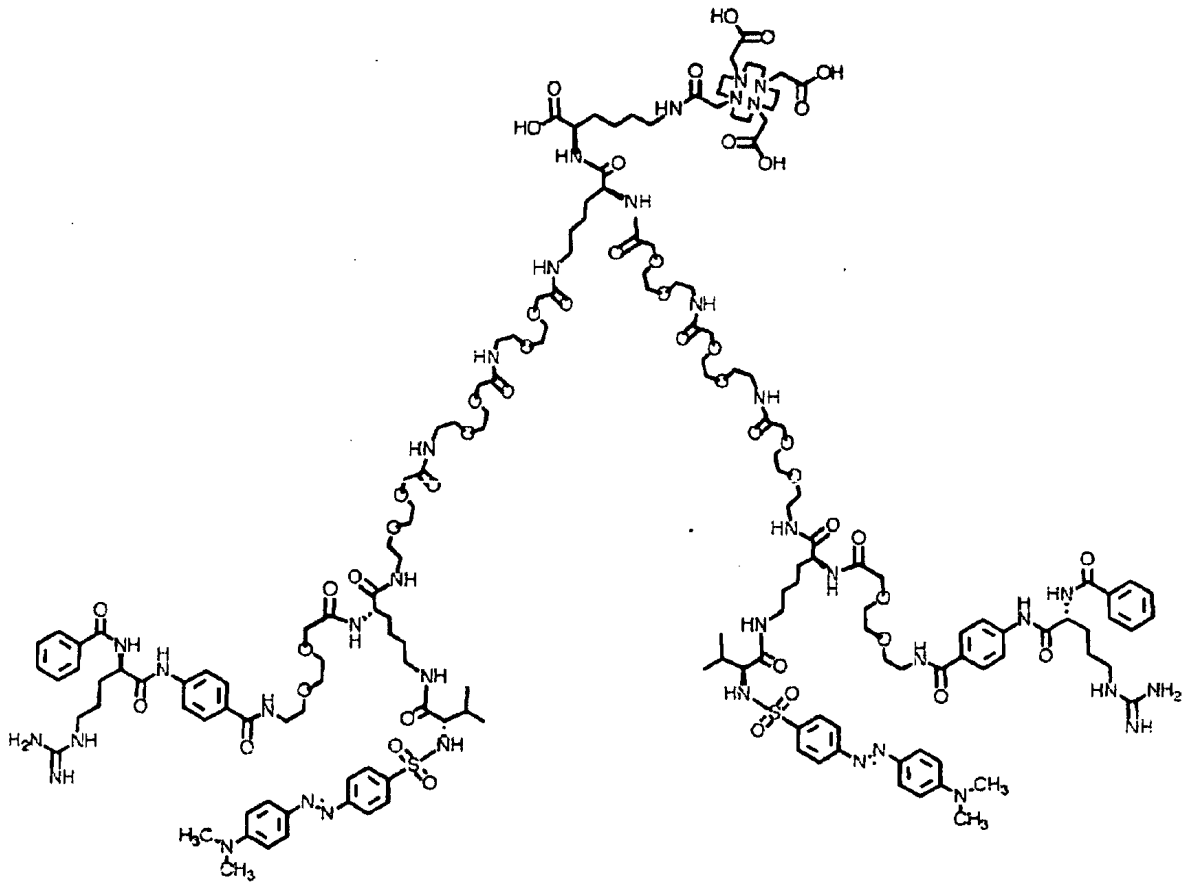


Fig. 25A

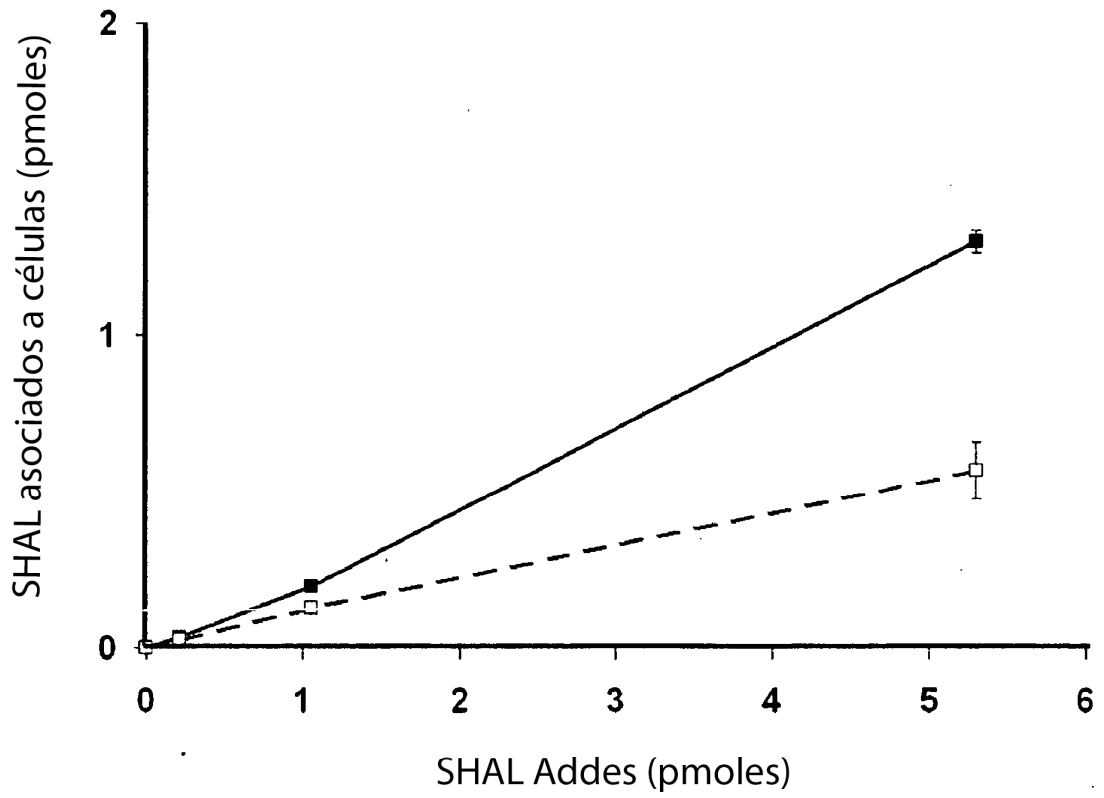


Fig. 26

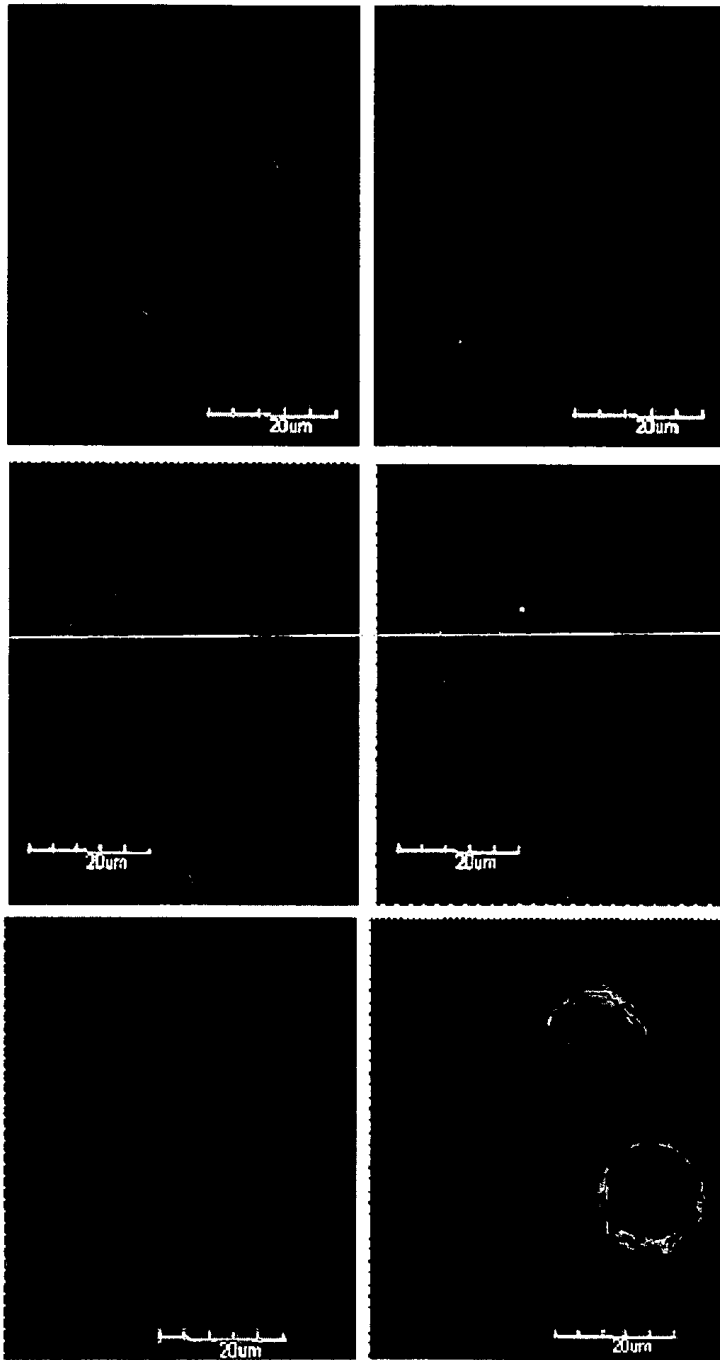


Fig. 27

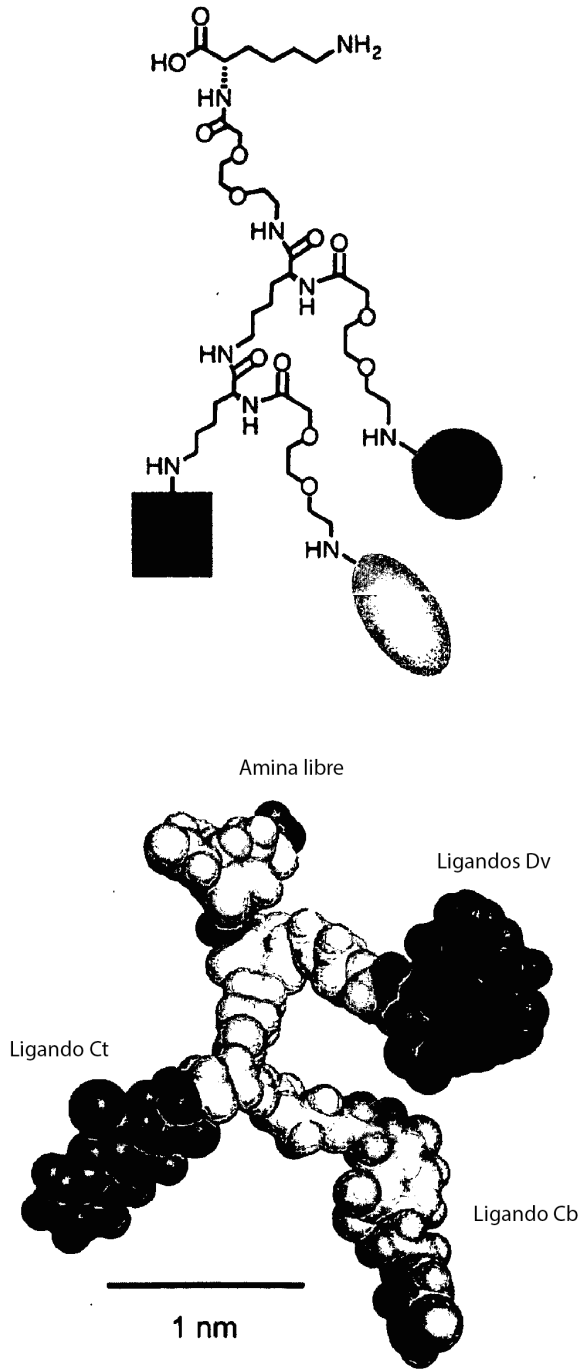


Fig. 28

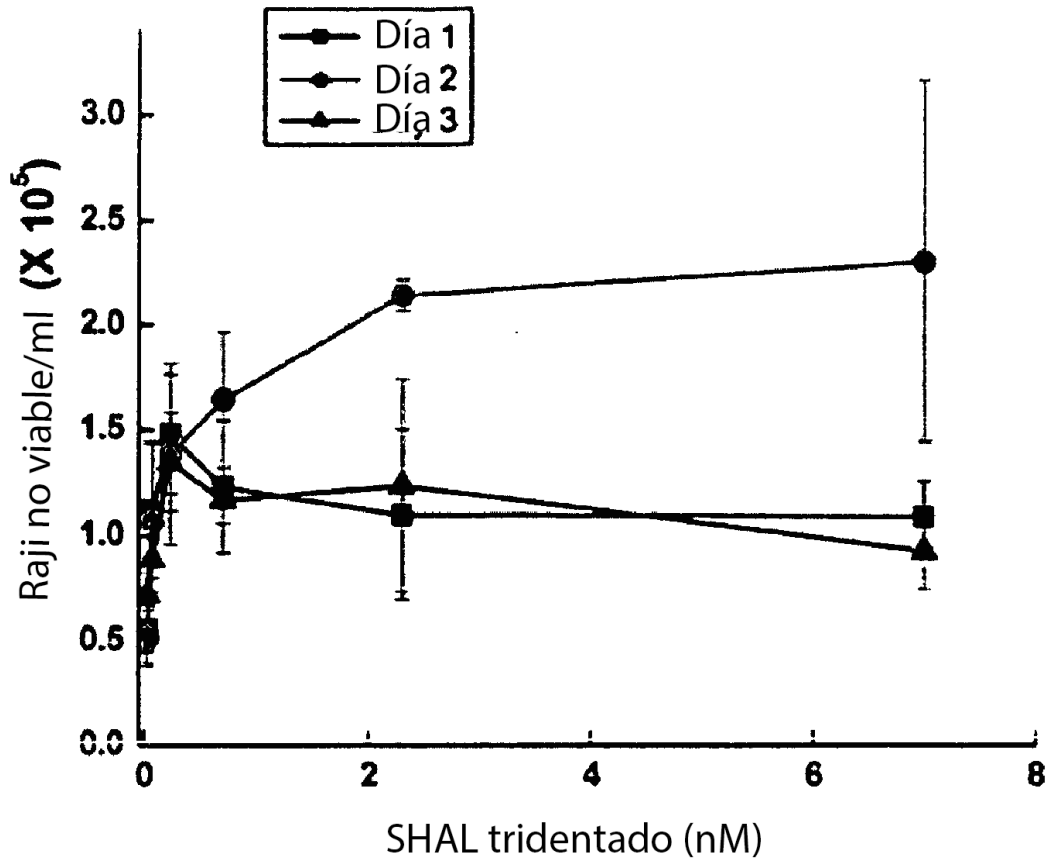


Fig. 29

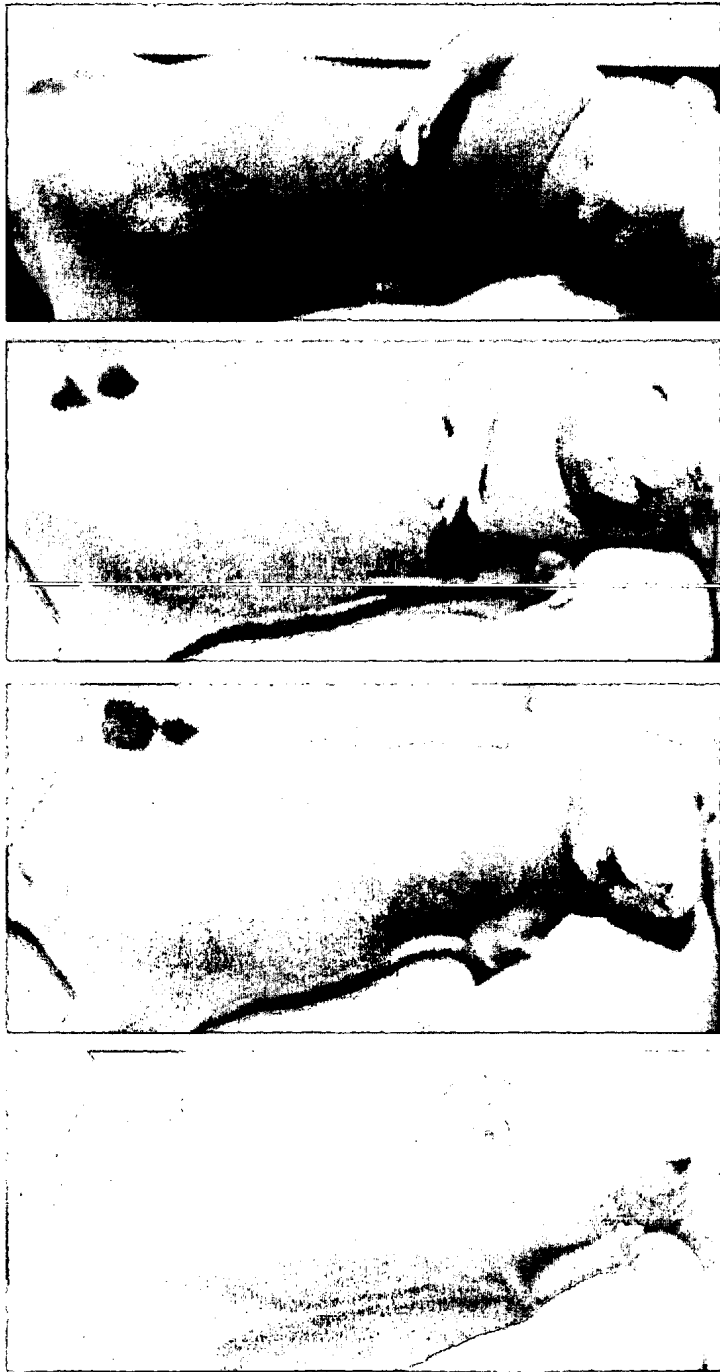


Fig. 30

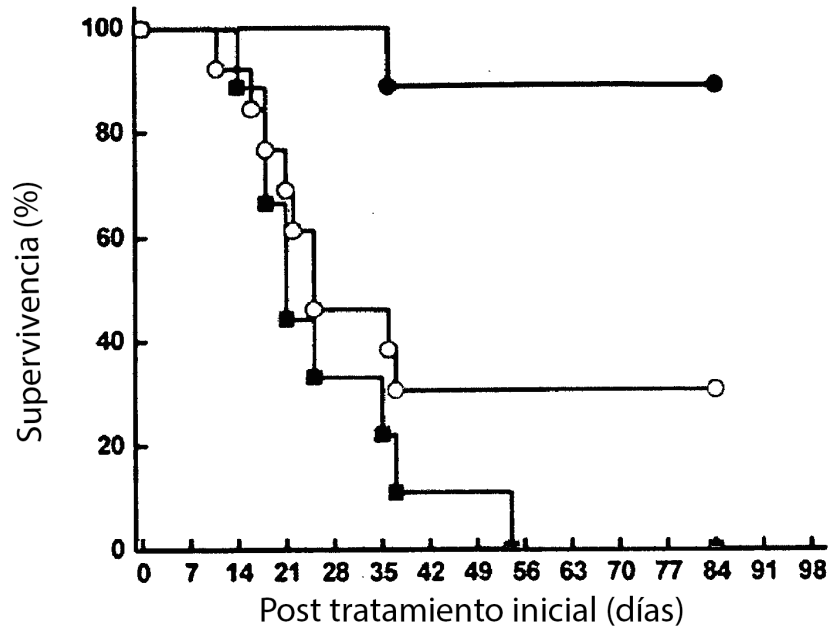


Fig. 31

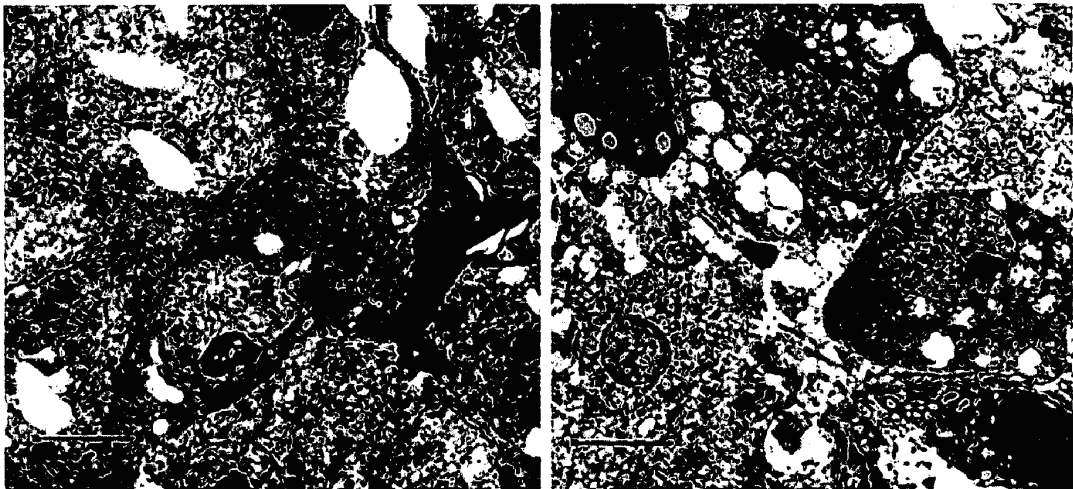


Fig. 32