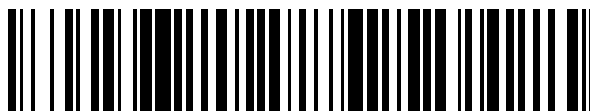


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 104**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/68** (2007.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2010 PCT/EP2010/002205**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2010 WO2010115629**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2010 E 10713429 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2416804**

54 Título: **Componentes de unión a la superficie de células terapéuticas provistos de amatoxina diseñados para terapia de tumores**

30 Prioridad:

**08.04.2009 US 167690 P**

**01.07.2009 US 222227 P**

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

**03.07.2017**

73 Titular/es:

**FAULSTICH, HEINZ, DR. (50.0%)**

**Greifstrasse 21**

**69123 Heidelberg, DE y**

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM**

**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MOLDENHAUER, GERHARD;**

**WERNER, SIMON;**

**ANDERL, JAN y**

**MULLER, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones :

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

**ES 2 621 104 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

Componentes de unión a la superficie de células terapéuticas provistos de amatoxina diseñados para terapia de tumores

Campo de la invención

5 La invención se refiere a terapia de tumores. En un aspecto, la presente invención se refiere a conjugados de una toxina y una unidad estructural de unión a una diana, por ejemplo, un anticuerpo, que son útiles en el tratamiento del cáncer. En particular, la toxina es una amatoxina, y la unidad estructural de unión a una diana se dirige preferiblemente contra antígenos asociados a tumores. En particular, la amatoxina se conjuga con el anticuerpo por unidades estructurales enlazantes. En particular, las unidades estructurales enlazantes están unidas covalentemente a grupos funcionales situados en posiciones de la amatoxina demostradas como posiciones preferidas para la unión de enlazantes con respecto a la actividad antitumoral óptima. En un aspecto adicional, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden tales conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana y al uso de tales conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana para la preparación de tales composiciones farmacéuticas. Los conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana y composiciones farmacéuticas de la invención son útiles para el tratamiento de cáncer.

Antecedentes de la invención y estado de la técnica

Se ha establecido terapia de anticuerpos para el tratamiento dirigido de pacientes con cáncer, trastornos inmunológicos y angiogénicos. El uso de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), esto es inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, esto es fármacos para matar o inhibir las células tumorales en el tratamiento del cáncer teóricamente permiten el suministro dirigido de la unidad estructural del fármaco a los tumores y la acumulación intracelular en el mismo, donde la administración sistémica de estos fármacos no conjugados puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como, las células tumorales buscadas para ser. Se busca por lo tanto la eficacia máxima con toxicidad mínima. Los esfuerzos para diseñar y refinar ADC se han centrado en la selectividad de los anticuerpos monoclonales (mAbs), así como en las propiedades de enlace de fármacos y liberación de fármacos. Tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales han sido reportados como útiles en estas estrategias.

Amatoxinas

Las amatoxinas son péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos. Se pueden aislar de los hongos *Amanita phalloides* o preparar a partir de los bloques de construcción por síntesis. Las amatoxinas inhiben específicamente la ARN polimerasa II dependiente de ADN de las células de mamífero, y por lo tanto también la transcripción y la biosíntesis de proteínas de las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula causa detención del crecimiento y proliferación. Aunque no está unido covalentemente, el complejo entre la amanitina y la ARN polimerasa II es muy apretado ( $K_D = 3$  nM). La disociación de la amanitina de la enzima es un proceso muy lento lo que hace improbable la recuperación de una célula afectada. Cuando la inhibición de la transcripción dura demasiado tiempo, la célula sufrirá muerte celular programada (apoptosis).

Conjugados de amatoxinas y unidades estructurales de unión a una diana

La solicitud de patente anterior EP 1 859 811 A1 (publicada el 28 de noviembre de 2007) por los inventores describe conjugados, en los que  $\beta$ -amanitina está acoplada a albúmina o a los anticuerpos monoclonales HEA125, OKT3 y PA-1. Además, se estudió el efecto inhibitor de estos conjugados sobre la proliferación de las células de cáncer de mama (MCF-7), células de linfoma de Burkitt (Raji) y células de linfoma T (Jurkat).

Antígeno de la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM)

La molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM, CD326) es uno de los antígenos diana más estudiados en tumores humanos (Trzpis et al., 2007; Baeuerle and Gires, 2007). Representa una glicoproteína de membrana tipo I de 314 aminoácidos con un peso molecular aparente de 40 kDa (Balzar et al., 1999). Está sobreexpresado en la mayoría de los adenocarcinomas (Winter et al., 2003; Went et al., 2004). En particular, la expresión de EpCAM se mejora en cáncer de mama con ganglios positivos, cáncer de ovario epitelial, colangiocarcinoma, adenocarcinoma pancreático y cáncer de cabeza y cuello de células escamosas. El aumento de la expresión de EpCAM es indicativo de un mal pronóstico en los carcinomas de la mama y de la vesícula biliar (Gastl et al., 2000; Varga et al., 2004; Spizzo et al., 2002; Spizzo et al., 2004). Es importante destacar que EpCAM se expresa por células madre de cáncer e iniciadoras de tumores en carcinomas mamarios, colorrectales y pancreáticos (Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007; Li et al., 2007).

Los anticuerpos monoclonales específicos de EpCAM se han utilizado como una herramienta de diagnóstico para la detección de células tumorales circulantes raras en pacientes con cáncer (Allard et al., 2004; Nagrath et al., 2007). Un par de anticuerpos anti-EpCAM diseñados actualmente se investigan en estudios clínicos.

## Antígeno HER2

HER2 (Her2/neu, ErbB2), una tirosina quinasa receptora con un peso molecular aparente de 185 kDa se sobreexpresa en aproximadamente 25-30% de cánceres de mama humanos y cánceres gástricos. Esta sobreexpresión, que a menudo se debe a la amplificación del gen codificador del receptor, generalmente representa un mal pronóstico, a menudo implicando enfermedad progresiva en los años posteriores al diagnóstico inicial.

La terapia con anticuerpos monoclonales se ha establecido para el tratamiento dirigido de pacientes con cánceres Her2/neu-positivos. HERCEPTIN® (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente con alta afinidad en un ensayo basado en células (Kd = 5 nM) al dominio extracelular de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, HER2 (ErbB2). Trastuzumab es un anticuerpo kappa IgG1 que contiene regiones marco humanas con las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo murino (4D5) que se une a HER2. El trastuzumab se une al antígeno HER2 y de este modo inhibe el crecimiento de células cancerosas. Debido a que el trastuzumab es un anticuerpo humanizado, minimiza cualquier respuesta de HAMA en pacientes. El trastuzumab se ha demostrado, tanto en ensayos *in vitro* como en animales, para inhibir la proliferación de las células tumorales humanas que sobreexpresan HER2. El trastuzumab es un mediador de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, ADCC. HERCEPTIN® es clínicamente activo en pacientes con cánceres de mama metastáticos que sobreexpresan ErbB2 que han recibido extensa terapia anti-cáncer previa. Aunque HERCEPTIN® es un avance en el tratamiento de pacientes con cánceres de mama que sobreexpresan ErbB2 y que han recibido extensa terapia anti-cáncer previa, la mayoría de los pacientes de esta población no responden o responden mal al tratamiento con HERCEPTIN®. Por lo tanto, existe una necesidad clínica significativa de desarrollar terapias adicionales de cáncer dirigidas por HER2 para aquellos pacientes con tumores que sobreexpresan HER2 u otras enfermedades asociadas con la expresión de HER2 que no responden, o responden mal al tratamiento con HERCEPTIN®.

## Problemas técnicos que subyacen a la presente invención

Había una necesidad en la técnica anterior de conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana que ejercen sus efectos tóxicos a células o tejidos diana a una concentración mucho menor, de manera que los conjugados se pueden administrar a concentraciones más bajas y se minimizan los efectos secundarios dañinos a células no diana. Además, existía una necesidad en la técnica anterior para el tratamiento de otros tipos de cáncer, particularmente aquellos que eran resistentes a la terapia, o que respondían pobremente a terapias tumorales reales.

La presente invención satisface estas y otras necesidades. Por ejemplo, los inventores descubrieron en los experimentos subyacentes a la presente invención que se pueden construir conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana muy eficaces, en particular conjugados de anticuerpo de amatoxina, eligiendo puntos de enlace particulares en la parte de amatoxina del conjugado y eligiendo compuestos de enlazante particular. Tales conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana son muy eficaces en que ejercen su actividad tóxica a las células diana a concentraciones muy bajas (IC<sub>50</sub> de aproximadamente  $5 \times 10^{-12}$  M) así como por ser altamente específicas para sus células diana. Sin desear estar limitadas por una teoría particular, estas ventajas podrían explicarse en que la unión entre la unidad estructural de unión a una diana y la amatoxina o, si está presente, entre el enlazante y la amatoxina se escinde eficientemente dentro de la célula diana y en un grado mucho mayor fuera de la célula.

La descripción anterior no describe necesariamente todos los problemas resueltos por la presente invención.

## Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana, que comprende: (i) una unidad estructural de unión a una diana; (ii) al menos una amatoxina; y (iii) opcionalmente un enlazante L3; en donde la al menos una amatoxina está conectada a la unidad estructural de unión a una diana o, si está presente, al enlazante L3 a través del átomo de C  $\delta$  del aminoácido 3 de la amatoxina; en donde la unidad estructural de unión a una diana se selecciona del grupo que consiste en: (i) anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de los mismos; (ii) proteína similar al anticuerpo, en donde dicha proteína de tipo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, anticalinas, proteínas de repetición de anquirina diseñadas y proteínas con andamios basados en ubiquitina; y (iii) aptámero de ácido nucleico.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de acuerdo con el primer aspecto para uso en medicina.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de acuerdo con el primer o el segundo aspecto para el tratamiento del cáncer o de una enfermedad autoinmune en un paciente, en donde el cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cáncer pancreático, colangiocarcinoma, cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, tumores cerebrales, tumores en la infancia, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de piel epitelial, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno y en donde la enfermedad autoinmune se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en espondilitis anquilosante, enfermedad de Chagas,

5 enfermedad de Crohn, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS), enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso, enfermedad mixta del tejido conectivo, miastenia gravis, narcolepsia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, psoriasis, artritis psoriásica, polimiositis, cirrosis biliar primaria, policondritis reincidente, artritis reumatoide, esquizofrenia, síndrome de Sjögren, arteritis temporal, colitis ulcerativa, vasculitis granulomatosis de Wegener, en particular artritis reumatoide.

10 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un tipo de conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de acuerdo con el primer aspecto y que comprende además uno o más diluyentes, portadores, excipientes, agentes de carga, aglutinantes, lubricantes, deslizantes, desintegramientos, adsorbentes; y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.

Este resumen de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

#### Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra las fórmulas estructurales de diferentes amatoxinas. Los números en negrita (1 a 8) designan la numeración estándar de los ocho aminoácidos que forman la amatoxina. También se muestran las designaciones estándar de los átomos de los aminoácidos 1, 3 y 4 (letras griegas  $\alpha$  a  $\gamma$ , letras griegas  $\alpha$  a  $\beta$  y números de 1' a 7', respectivamente).

20 La figura 2 muestra una comparación de las afinidades de unión de huHEA125-Ama y huHEA125 a las células diana mediante un análisis de competencia de unión. Las células Colo205 que expresan EpCAM se incubaron con una cantidad fija de anticuerpo HEA125 de ratón marcado directamente con FITC. La unión a células diana se analizó por citometría de flujo. La competencia de unión con cantidades crecientes de huHEA125-Ama o huHEA125 reveló una afinidad muy similar hacia el antígeno diana.

25 La figura 3 muestra la expresión superficial del antígeno EpCAM sobre diversas líneas celulares de carcinoma detectadas por inmunofluorescencia indirecta: la figura 3A Capan-1; la figura 3B Colo205; la figura 3C OZ; y la figura 3D MCF-7. Los histogramas sombreados en gris en el lado izquierdo de cada diagrama muestran los resultados obtenidos con el anticuerpo control Xolair®; los histogramas que tienen un área blanca en el lado derecho de cada diagrama muestran los resultados obtenidos con el anticuerpo huHEA125. La abreviatura FL1-H representa "altura de fluorescencia 1", que significa la intensidad de fluorescencia 1, esto es, el canal verde para FITC.

30 La figura 4 muestra la unión de conjugados de huHEA125-Amanitina y huHEA125-Faloidina a células de cáncer de mama MCF-7 analizadas por citometría de flujo. La abreviatura FL1-H representa "altura de fluorescencia 1", que significa la intensidad de fluorescencia 1, esto es, el canal verde para FITC.

A: histograma en negrita, huHEA125-Amanitinal; histograma sombreado, huHEA125; histograma punteado, Xolair (control negativo);

B: histograma en negrita, huHEA125-Amanitina4; histograma sombreado, huHEA125; histograma punteado, Xolair (control negativo);

35 C: histograma en negrita, huHEA125- $\alpha$ -Faloidina; histograma sombreado, huHEA125; histograma punteado, Xolair (control negativo).

La figura 5 muestra una comparación de la inhibición de la proliferación de las células MCF-7 provocada por el conjugado huHEA125-Amanitinal, el control no unido conjugado Xolair-Amanitina1, y sin Amanitina.

40 La figura 6 muestra una comparación de la inhibición de la proliferación de las células MCF-7 causada por el conjugado huHEA125-Amanitina4, el conjugado alfa-faloidina-huHEA125 y sin Amanitina.

La figura 7 muestra una comparación de la inhibición de la proliferación de las células Capan-1 causada por el conjugado huHEA125-Amanitina3, el anticuerpo de control provisto de Amanitina Xolair®, y sin Amanitina.

La figura 8 muestra una comparación de la inhibición de la proliferación de las células Colo205 causada por el conjugado huHEA125-Amanitina3, el anticuerpo de control provisto de Amanitina Xolair® y sin Amanitina.

45 La figura 9 muestra una comparación de la inhibición de la proliferación de las células MCF-7 causada por el conjugado huHEA125-Amanitina3, el anticuerpo de control provisto de Amanitina Xolair® y sin Amanitina.

La figura 10 muestra una comparación de la inhibición de la proliferación de las células OZ causada por el conjugado huHEA125-Amanitina3, el anticuerpo de control provisto de Amanitina Xolair® y sin Amanitina.

La figura 11 A a D muestra una comparación de la inhibición sobre la proliferación celular ejercida por diversos conjugados de  $\alpha$ -amanitina a diferentes concentraciones de amanitina utilizando las líneas celulares positivas de Her2/neu, SKOV-3, SKBR-3 y NCI-N87, así como la línea celular negativa de Her2/Neu, MDA-MB231

5 La figura 12 muestra la actividad antitumoral de diversos conjugados de  $\alpha$ -amanitina en dos concentraciones diferentes (A: 30  $\mu$ g/kg y B: 150  $\mu$ g/kg de peso corporal) en un modelo de tumor de xenoinjerto SKOV-3 *in vivo*.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

10 Antes de que la presente invención se describa en detalle más adelante, se debe entender que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en este documento, ya que pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en este documento es con el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que comúnmente entienden los expertos en el arte.

15 Preferiblemente, los términos utilizados en este documento se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH- 4010 Basel, Switzerland).

20 A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo exija de otro modo, se entenderá que la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implicará la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de número entero o etapa.

25 El término "unidad estructural de unión a una diana", como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier molécula o parte de una molécula que se puede unir específicamente a una molécula diana o epítipo diana. Las unidades estructurales de unión a una diana en el contexto de la presente solicitud son (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos; (ii) proteínas de tipo anticuerpo; y (iii) aptámeros de ácido nucleico. Las "unidades estructurales de unión a una diana" apropiadas para uso en la presente invención tienen por lo general una masa molecular de al menos 15 kDa, al menos 20 kDa, al menos 30 kDa o de al menos 40 kDa o más.

Como se utiliza en este documento, un "anticuerpo conjugado de toxina" se refiere a un conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana en el que la unidad estructural de unión a una diana es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de los mismos de acuerdo con alternativa (i) anterior.

30 Como se utiliza en este documento, un "conjugado de toxina de proteína de tipo anticuerpo" se refiere a un conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana en el que la unidad estructural de unión a una diana es una proteína de tipo anticuerpo de acuerdo con alternativa (ii) anterior.

35 Como se utiliza en este documento, un "aptámero conjugado" se refiere a un conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana en el que la unidad estructural de unión a una diana es un aptámero de ácido nucleico de acuerdo con alternativa (iii) anterior.

40 En el contexto de la presente solicitud, los términos "molécula diana" y "epítipo diana", respectivamente, se refieren a un antígeno y un epítipo de un antígeno, respectivamente, que está específicamente unido a una unidad estructural de unión a una diana, preferiblemente la molécula diana es un antígeno asociado a un tumor, en particular un antígeno o un epítipo que está presente en la superficie de uno o más tipos de células tumorales en una concentración aumentada y/o en una configuración estérica diferente en comparación con la superficie de células no tumorales o un antígeno expresado preferencialmente en células implicadas en enfermedades autoinmunes, ejemplos de tales antígenos son la parte de Fc de la inmunoglobulina G, receptor de la tirotrópina, colágeno de tipo IV, proteinasa 3, ADN topoisomerasa I, placoglobina. Preferiblemente, dicho antígeno o epítipo está presente en la superficie de uno o más tipos de células tumorales, pero no en la superficie de células no tumorales.

45 Preferiblemente, el término "antígeno asociado a tumores" comprende todas las sustancias que provocan una respuesta inmune contra un tumor. Sustancias apropiadas particulares son aquellas que están enriquecidas en una célula tumoral en comparación con una célula sana. Estas sustancias están preferiblemente presentes dentro y/o son accesibles en el exterior de la célula tumoral. Si el antígeno tumoral sólo está presente dentro de una célula tumoral, seguirá siendo accesible para el sistema inmunitario, puesto que el antígeno o sus fragmentos serán presentados por el sistema MHC en la superficie de la célula. En un aspecto preferido, el antígeno tumoral está casi exclusivamente presente en y/o en la célula tumoral y no en una célula sana del mismo tipo celular.

Los antígenos tumorales apropiadas pueden ser identificados, por ejemplo, analizando la expresión diferencial de proteínas entre el tumor y las células sanas de los mismos tipo celular utilizando un enfoque basado en micromatriz

(Russo et al., *Oncogene*. 2003,22: 6497-507), mediante cribado basado en PCR o micromatriz para genes celulares mutados específicos de tumores (Heller, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2002, 4: 129-53) o por identificación serológica de antígenos mediante clonación de expresión recombinante (SEREX; Tureci et al., *Mol Med Today*. 1997,3 : 342-349). El experto en el arte conoce un gran número de sustancias que están preferencial o exclusivamente presentes en y/o en células tumorales, que incluyen, por ejemplo, oncogenes como, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico truncado, la proteína de unión al folato, la melanoferrina, el antígeno carcinoembrionario, antígeno de membrana específico de la próstata, HER2-neu y ciertas cadenas de azúcar como, por ejemplo, mucinas epiteliales.

Se prefiere que se seleccionen antígenos tumorales, lo que provoca una respuesta inmune fuerte, preferencialmente una respuesta inmune de MHC de clase I. Los antígenos que provocan una respuesta inmune fuerte inducirán al menos 1%, preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 10% y más preferiblemente al menos 15% de células CD4<sup>+</sup> T o CD8<sup>+</sup> T productoras de IFN- $\gamma$  aisladas de ratones previamente inmunizados con el antígeno, tras la estimulación con el antígeno y/o inducirán preferiblemente al menos 5%, y más preferiblemente al menos 15% de células B aisladas de ratones previamente inmunizados con el antígeno, tras la estimulación con el antígeno para proliferar. Los antígenos que cumplen estos criterios son candidatos para uso en vacunas de cáncer terapéuticas y/o profilácticas.

En una realización preferida particular el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en antígenos asociados con el cáncer definidos en células T o células B pertenecientes a productos génicos únicos de genes celulares mutados o recombinados, en particular quinasas dependientes de la ciclina (por ejemplo, CDC2, CDK2, CDK4), p15<sup>Ink4b</sup>, p53, AFP,  $\beta$ -catenina, caspasa 8, p53, producto de fusión Bcrabl, MUM-1 MUM-2, MUM-3, ELF2M, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, RAGE, miosina/m, 707-AP, CDC27/m, ETV6/AML, TEL/Amll, Dekcain, LDLR/FUT, Pml-RARa, TEL/AML1; antígenos del cáncer de testículos (CT), en particular NY-ESO-1, miembros de la familia MAGE (MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-10, MAGE 12), BAGE, DAM-6, DAM-10, miembros de la familia GAGE (GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE- 6, GAGE-7B, GAGE- 8), NY-ESO-1, NA-88A, CAG-3, antígeno asociado a RCC G250; antígenos de virus tumorales, en particular oncoproteínas E6 o E7 derivadas del virus del papiloma humano (HPV), virus Epstein Barr EBNA2-6, LMP-1, LMP-2; antígenos de diferenciación específica de tejido o sobreexpresada, en particular gp77, gp100, MART-1/Melan-A, p53, tirosinasa, proteína relacionada con la tirosina (TRP-1 y TPR-2), PSA, PSM, MC1R; antígenos ampliamente expresados, en particular ART4, CAMEL, CEA, CypB, EpCAM, HER2/neu, hTERT, hTRT, ICE, Muc1 Muc2, PRAME RU1, RU2, SART-1, SART-2, SART-3, y WT1; y fragmentos y derivados de los mismos. Los antígenos tumorales particularmente preferidos son antígenos derivados de HER-2 y EpCAM. En el contexto de esta sección, el término fragmento se refiere a proteínas suprimidas terminalmente en C y/o terminalmente en N, que comprenden al menos un epítipo que puede estar específicamente unido por una unidad estructural de unión a una diana.

El término "anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de los mismos", como se utiliza en este documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, esto es, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. También se incluyen proteínas de tipo inmunoglobulina que se seleccionan mediante técnicas que incluyen, por ejemplo, expresión en fagos para unirse específicamente a una molécula diana, por ejemplo, a la proteína diana EpCAM o Her2. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de la molécula de inmunoglobulina. "Anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos" apropiados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, humanos, humanizados (en particular injertados con CDR), desinmunizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo, scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, diacuerpos o tetracuerpos (Holliger P. et al., 1993), nanocuerpos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, los fragmentos de unión al antígeno son fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos humanos de la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv con enlace disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden ya sea un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender el(los) dominio(s) variable(s) solo(s) o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CL, CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención los fragmentos de unión al antígeno que comprenden también cualquier combinación de dominio(s) variable(s) con una región bisagra, dominios CL, CH1, CH2 y CH3.

Los anticuerpos utilizables en la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son de origen humano, roedor (por ejemplo, ratón, rata, conejillo de indias o conejo), pollo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, burro, gato o perro. Se prefiere particularmente que los anticuerpos sean de origen humano o murino. Como se utiliza en este documento, los "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan

inmunoglobulinas endógenas, como se describe por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos No. 5,939,598 de Kucherlapati & Jakobovits.

5 El término "proteína de tipo anticuerpo" se refiere a una proteína que ha sido modificada genéticamente (por ejemplo, por mutagénesis de bucles) para unirse específicamente a una molécula diana. Por lo general, dicha proteína de tipo anticuerpo comprende al menos un bucle de péptido variable unido a ambos extremos a un andamio de proteínas. Esta doble restricción estructural aumenta en gran medida la afinidad de unión de la proteína de tipo anticuerpo a niveles comparables a los de un anticuerpo. La longitud del bucle de péptido variable por lo general consiste en 10 a 20 aminoácidos. La proteína de andamio puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. Preferiblemente, la proteína de andamio es una proteína globular pequeña. Las proteínas de tipo anticuerpo incluyen anticuerpos, anticalinas, proteínas de repetición Ankyrin diseñadas (para revisión véase: Binz et al., 2005) y proteínas con andamios basados en ubiquitina. Las proteínas de tipo anticuerpo se pueden derivar de grandes bibliotecas de mutantes, por ejemplo, se exploran a partir de bibliotecas grandes de expresión en fagos y se pueden aislar en analogía a anticuerpos regulares. También, se pueden obtener proteínas de unión de tipo anticuerpo mediante mutagénesis combinatoria de residuos expuestos a la superficie en proteínas globulares.

15 El término "aptámero de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que modificada genéticamente a través de rondas repetidas de selección *in vitro* o SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) para unirse a una molécula diana (para una revisión véase: Brody and Gold, 2000). El aptámero de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN o ARN. Los aptámeros pueden contener modificaciones, por ejemplo, nucleótidos modificados tales como pirimidinas sustituidas con 2'- flúor.

20 El término "amatoxina" incluye todos los péptidos cíclicos compuestos de 8 aminoácidos como aislados del género Amanita y descritos en la ref. (Wieland, T. and Faulstich H., 1978); además todos sus análogos sintéticos construidos a partir de bloques de construcción de acuerdo con la estructura maestra de los compuestos naturales (cíclicos, 8 aminoácidos), además todos los análogos sintéticos o semisintéticos que contienen aminoácidos no hidroxilados en lugar de los aminoácidos hidroxilados, además todos los análogos sintéticos o semisintéticos, en los que la unidad estructural tioéter sulfóxido se reemplaza por un sulfuro, sulfona, o por átomos diferentes del azufre, por ejemplo, un átomo de carbono como en un carbaanálogo de amanitina.

30 Funcionalmente, las amatoxinas se definen como péptidos o depsipeptidos que inhiben la ARN polimerasa II de mamífero. Las amatoxinas preferidas son aquellas con un grupo funcional (por ejemplo, un grupo carboxílico, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un tiol o un grupo de captura de tiol) que se pueden hacer reaccionar con moléculas enlazantes o unidades estructurales de unión a una diana como se ha definido anteriormente. Las amatoxinas que son particularmente apropiadas para los conjugados de la presente invención son  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\alpha$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina y ácido amanulínico como se muestra en la figura 1, así como sales, análogos semisintéticos y análogos sintéticos de los mismos. Las amatoxinas particularmente preferidas para uso en la presente invención son  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina y amaninamida.

35 Como se utiliza en este documento, un "derivado químico" (o corto: un "derivado") de un compuesto se refiere a una especie que tiene una estructura química que es similar al compuesto, conteniendo al menos un grupo químico no presente en el compuesto y/o deficiente de al menos un grupo químico que está presente en el compuesto. El compuesto al que se compara el derivado se conoce como el compuesto "original". Por lo general, se puede producir un "derivado" a partir del compuesto original en una o más etapas de reacción química.

40 Como se utiliza en este documento, un "análogo" de un compuesto se relaciona estructuralmente pero no idéntico al compuesto y presenta al menos una actividad del compuesto. El compuesto al que se compara el análogo se conoce como el compuesto "original". Las actividades antes mencionadas incluyen, sin limitación: actividad de unión a otro compuesto; actividad inhibidora, por ejemplo, actividad inhibidora de la enzima; efectos tóxicos; actividad activadora, por ejemplo, actividad de activación enzimática. No se requiere que el análogo presente dicha actividad en la misma medida que el compuesto original. Un compuesto se considera como un análogo dentro del contexto de la presente solicitud, si presenta la actividad relevante en un grado de al menos 1% (más preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, y más preferiblemente al menos 50%) de la actividad del compuesto original. De este modo, un "análogo de una amatoxina", como se utiliza en este documento, se refiere a un compuesto que está estructuralmente relacionado con una cualquiera de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, y ácido amanulínico como se muestra en la figura 1 y que presenta al menos 1% (más preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, y más preferiblemente al menos 50%) de la actividad inhibidora contra la ARN polimerasa II de mamífero en comparación con al menos una de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\varepsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, y ácido amanulínico. Un "análogo de una amatoxina" apropiado para su uso en la presente invención puede presentar incluso una mayor actividad inhibidora contra la ARN polimerasa II de mamífero que una cualquiera de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\varepsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, o ácido amanulínico. La actividad inhibidora se puede medir determinando la concentración a la que se produce el 50% de inhibición (valor IC<sub>50</sub>). La actividad inhibidora contra la ARN polimerasa II de mamífero se puede determinar

indirectamente midiendo la actividad inhibidora sobre la proliferación celular. En el ejemplo 3 se describe un ensayo apropiado para medir la inhibición de la proliferación celular.

Un "análogo semisintético" se refiere a un análogo que se ha obtenido por síntesis química utilizando compuestos de fuentes naturales (por ejemplo, materiales vegetales, cultivos bacterianos o cultivos celulares) como material de partida. Por lo general, un "análogo semisintético" de la presente invención se ha sintetizado partiendo de un compuesto aislado de un hongo de la familia Amanita. Por el contrario, un "análogo sintético" se refiere a un análogo sintetizado mediante la denominada síntesis total de pequeños bloques de construcción (por lo general petroquímicos). Por lo general, esta síntesis total se lleva a cabo sin la ayuda de procesos biológicos.

Un "enlazante" en el contexto de la presente solicitud se refiere a una molécula que aumenta la distancia entre dos componentes, por ejemplo, para aliviar interferencia estérica entre la unidad estructural de unión a una diana y la amatoxina, que puede disminuir de otra manera la capacidad de la amatoxina para interactuar con ARN polimerasa II. El enlazante puede servir a otro propósito, ya que puede facilitar la liberación de la amatoxina específicamente en la célula que está siendo dirigida por la unidad estructural de unión a una diana. Se prefiere que el enlazante y preferiblemente la unión entre el enlazante y la amatoxina en un lado y la unión entre el enlazante y el anticuerpo en el otro lado sea estable bajo las condiciones fisiológicas fuera de la célula, por ejemplo, la sangre, mientras que puede escindirse dentro de la célula, en particular dentro de la célula diana, por ejemplo, células cancerosas o células inmunes. Para proporcionar esta estabilidad selectiva, el enlazante puede comprender funcionalidades que son preferiblemente sensibles al pH para generar enlazantes sensibles al pH como se describe, por ejemplo, en S. Fletcher, M. R. Jorgensens and A. D. Miller; Org. Lett. 2004, 6(23), pp 4245-4248, o sensibles a la proteasa para generar enlazantes sensibles a la proteasa como se describe, por ejemplo, en L. DA Ibsen, Blood 2003, 102, 1458-65 o Francisco JA, Cerrony CG, Meyer DL, Nat. Biotechnol 2003, 21, 778-84. Alternativamente, el enlace que une el enlazante a la unidad estructural de unión a una diana puede proporcionar la estabilidad selectiva. Preferiblemente, un enlazante tiene una longitud de al menos 1, preferiblemente de 1-20 átomos de longitud (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono) en donde un lado del enlazante se ha hecho reaccionar con la amatoxina y, el otro lado con una unidad estructural de unión a una diana. En el contexto de la presente invención, un enlazante es preferiblemente un alquilo C<sub>1-20</sub>, heteroalquilo C<sub>1-20</sub>, alqueno C<sub>2-20</sub>, heteroalqueno C<sub>2-20</sub>, alquino C<sub>2-20</sub>, heteroalquino C<sub>2-20</sub>, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, o un grupo heteroaralquilo, opcionalmente sustituido. El enlazante puede contener uno o más elementos estructurales tales como amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, unidades estructurales hidrocarburo y similares. El enlazante también puede contener combinaciones de dos o más de estos elementos estructurales. Cada uno de estos elementos estructurales puede estar presente en el enlazante más de una vez, por ejemplo, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o seis veces. En algunas realizaciones, el enlazante puede comprender un enlace disulfuro. Se entiende que el enlazante tiene que estar unido ya sea en una sola etapa o en dos o más etapas posteriores a la amatoxina y a la unidad estructural de unión a una diana. Para ello, el enlazante que llevará dos grupos, preferiblemente en un extremo proximal y distal, que puede (i) formar un enlace covalente con un grupo, preferiblemente un grupo activado sobre una amatoxina o el péptido de unión a una diana o (ii) que es o se puede activar para formar un enlace covalente con un grupo sobre una amatoxina. De acuerdo con lo anterior, si el enlazante está presente, se prefiere que los grupos químicos estén en el extremo distal y proximal del enlazante, que son el resultado de dicha reacción de acoplamiento, por ejemplo, un éster, un éter, un uretano, un enlace peptídico, etc. La presencia de un "enlazante" es opcional, esto es, la toxina puede estar directamente unida a un residuo de la unidad estructural de unión a una diana en algunas realizaciones del conjugado de toxina de la unidad estructural de unión a una diana de la presente invención. Se prefiere que el enlazante esté conectado directamente a través de un enlace a la unidad estructural de direccionamiento, preferiblemente en su extremo. Si la unidad estructural de unión a una diana comprende grupos amino, carboxi o sulfhidrilo libres, por ejemplo, en forma de residuos Asp, Glu, Arg, Lys, Cys, que pueden estar comprendidos en un polipéptido, entonces se prefiere que el enlazante esté acoplado a dicho grupo.

Como se utiliza en este documento, se considera que un primer compuesto (por ejemplo, un anticuerpo) "se une específicamente" a un segundo compuesto (por ejemplo, un antígeno, tal como una proteína diana), si tiene una constante de disociación  $K_D$  con dicho segundo compuesto de 100  $\mu\text{M}$  o menos, preferiblemente 50  $\mu\text{M}$  o menos, preferiblemente 30  $\mu\text{M}$  o menos, preferiblemente 20  $\mu\text{M}$  o menos, preferiblemente 10  $\mu\text{M}$  o menos, preferiblemente 5  $\mu\text{M}$  o menos, más preferiblemente 1  $\mu\text{M}$  o menos, más preferiblemente 900 nM o menos, más preferiblemente 800 nM o menos, más preferiblemente 700 nM o menos, más preferiblemente 600 nM o menos, más preferiblemente 500 nM o menos, más preferiblemente 400 nM o menos, más preferiblemente 300 nM o menos, más preferiblemente 200 nM o menos, incluso más preferiblemente 100 nM o menos, incluso más preferiblemente 90 nM o menos, incluso más preferiblemente 80 nM o menos, incluso más preferiblemente 70 nM o menos, incluso más preferiblemente 60 nM o menos, incluso más preferiblemente 50 nM o menos, incluso más preferiblemente 40 nM o menos, incluso más preferiblemente 30 nM o menos, incluso más preferiblemente 20 nM o menos, e incluso más preferiblemente 10 nM o menos.

Como se utiliza en este documento, un "paciente" significa cualquier mamífero o ave que pueda beneficiarse de un tratamiento con los conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana descritos en este documento. Preferiblemente, un "paciente" se selecciona del grupo que consiste en animales de laboratorio (por ejemplo, ratón o rata), animales domésticos (incluyendo, por ejemplo, conejillo de indias, conejo, pollo, cerdo, oveja, cabra, camello,



vaca, caballo, burro, gato o perro), o primates incluyendo seres humanos. Se prefiere particularmente que el "paciente" sea un ser humano.

5 Como se utiliza en este documento, "tratar", "que trata" o "tratamiento" de una enfermedad o trastorno significa lograr uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar o prevenir el desarrollo de síntomas característicos del(los) trastorno(s) que se está(n) tratando; (c) inhibir el empeoramiento de los síntomas característicos del(los) trastorno(s) que se está(n) tratando; (d) limitar o prevenir la recurrencia del(los) trastorno(s) en pacientes que han tenido anteriormente el(los) trastorno(s); y (e) limitar o prevenir la recurrencia de los síntomas en pacientes que anteriormente eran sintomáticos para el(los) trastorno(s).

10 Como se utiliza en este documento, la "administración" incluye la administración *in vivo*, así como la administración directamente al tejido *ex vivo*, tal como injertos de vena.

15 Una "cantidad eficaz" es una cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr el propósito pretendido. La cantidad eficaz de un agente terapéutico determinado variará con factores tales como la naturaleza del agente, la ruta de administración, el tamaño y la especie del animal para recibir el agente terapéutico, y el propósito de la administración. La cantidad eficaz en cada caso individual puede ser determinada empíricamente por un experto en el arte según métodos establecidos en la técnica.

"Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por un organismo regulador del gobierno federal o de un estado o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

#### Realizaciones de la invención

20 La presente invención se describirá ahora con más detalle. En los pasajes siguientes se definen diferentes aspectos de la invención con más detalle. Cada aspecto así definido puede ser combinado con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

25 En un primer aspecto la presente invención se refiere a un conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana, que comprende: (i) una unidad estructural de unión a una diana; (ii) una amatoxina; y (iii) opcionalmente un enlazante L3; en donde la amatoxina está conectada a la unidad estructural de unión a una diana o, si está presente, al enlazante L3 a través del átomo de C  $\delta$  del aminoácido 3 de la amatoxina (véase la figura 1). En las amatoxinas preferidas utilizables en el primer aspecto, dicho aminoácido 3 es isoleucina,  $\gamma$ -hidroxil-isoleucina o  $\gamma,\delta$ -dihidroxi-isoleucina.

30 En una realización preferida del primer aspecto la amatoxina está conectada a la unidad estructural de unión a una diana o, si está presente, al enlazante L3 a través un átomo de oxígeno unido al átomo de C  $\delta$  del aminoácido 3 de la amatoxina. Se prefiere adicionalmente que la amatoxina esté conectada a la unidad estructural de unión a una diana o, si está presente, al enlazante L3 a través un enlace éster preferiblemente en la forma de una amatoxina-O-C(O)-L3-unidad estructural de unión diana o una amatoxina-O-C(O)-unidad estructural de unión a una diana, más  
35 preferiblemente una amatoxina- $\delta$ C-O-C(O)-L3-unidad estructural de unión a una diana o una amatoxina- $\delta$ C-O-C(O)-unidad estructural de unión a una diana, esto es una amatoxina- $\delta$ CH<sub>2</sub>-O-C(O)-L3-unidad estructural de unión a una diana o una amatoxina- $\delta$ CH<sub>2</sub>-O-C(O)-unidad estructural de unión a una diana; un enlace éter preferiblemente en la forma de una amatoxina-O-L3 o una amatoxina-O-unidad estructural de unión a una diana, preferiblemente una amatoxina- $\delta$ C-O-L3-unidad estructural de unión diana o una amatoxina- $\delta$ C-O-unidad estructural de unión diana, más  
40 preferiblemente una amatoxina- $\delta$ CH<sub>2</sub>-O-L3-unidad estructural de unión diana o una amatoxina- $\delta$ CH<sub>2</sub>-O-unidad estructural de unión diana; o un enlace uretano preferiblemente en la forma de una amatoxina-O-C(O)-NH-L3 o amatoxina-O-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana, preferiblemente una amatoxina- $\delta$ C-O-C(O)-NH-L3-unidad estructural de unión a una diana o una amatoxina- $\delta$ C-O-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana, esto  
45 es una amatoxina- $\delta$ CH<sub>2</sub>-O-C(O)-NH-L3-unidad estructural de unión a una diana o una amatoxina- $\delta$ CH<sub>2</sub>-O-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana. En estas realizaciones, se prefiere que el aminoácido 3 es  $\gamma,\delta$ -dihidroxiisoleucina.

En realizaciones preferidas del primer aspecto el enlazante L3 está presente y el conjugado tiene una de las siguientes estructuras: (i) amatoxina- $\delta$ C-O-C(O)-L3-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana; (ii) amatoxina- $\delta$ C-O-L3-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana; o (iii) amatoxina- $\delta$ C-O-C(O)-NH-L3-C(O)-NH-unidad estructural de  
50 unión a una diana, esto es (i) amatoxina- $\delta$ CH<sub>2</sub>-O-C(O)-L3-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana; (ii) amatoxina- $\delta$ CH<sub>2</sub>-O-L3-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana; o (iii) amatoxina- $\delta$ CH<sub>2</sub>-O-C(O)-NH-L3-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana.

55 En realizaciones preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión a una diana está conectada a la amatoxina o, si está presente, al enlazante L3 a través de un grupo amino presente en la unidad estructural de unión a una diana.

En realizaciones preferidas del primer aspecto la amatoxina se selecciona entre  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\delta$ -amanitina,  $\varepsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, o ácido amanulínico (todas mostradas en la figura 1), así como sales, análogos semisintéticos, y análogos sintéticos de los mismos. Las amatoxinas particularmente preferidas son  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina, y amaninamida, así como sales, análogos semisintéticos, y análogos sintéticos de los mismos.

5 La unidad estructural de unión diana es, en realizaciones preferidas una proteína, en particular un anticuerpo. Las proteínas y en particular anticuerpos comprenderán varios aminoácidos, que permiten el acoplamiento de amatoxinas. Los aminoácidos preferidos tienen grupos amino, hidroxilo, o carbonilo libres, incluyendo Lys, Gln, Glu, Asp, Asn, Thr, y Ser. De acuerdo con lo anterior, es posible acoplar más de una molécula de amatoxina a una molécula de proteína. Un aumento del número de amatoxinas por molécula también aumentará la toxicidad. De acuerdo con lo anterior, en una  
10 realización preferida la relación de proteína con amatoxina es entre 1 molécula de proteína a entre 1 y 15 moléculas de amatoxina, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15. Con el fin de calcular la relación en el caso de dímeros como IgG, el dímero se considera como una molécula. Se prefieren relaciones similares, si la unidad estructural de unión a una diana no es una proteína.

15 En realizaciones preferidas del primer aspecto, el enlazante L3 tiene significado y significados preferidos antes indicados. En otras realizaciones preferidas del primer aspecto, el enlazante L3 comprende un enlace disulfuro.

En realizaciones preferidas del primer aspecto, el enlazante L3 tiene una longitud de 1 a 20 átomos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. La longitud del enlazante se define como la conexión más corta-medida por el número de átomos o enlaces-entre la unidad estructural de toxina y la unidad estructural de unión a una diana.

20 En realizaciones preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión a una diana se une específicamente a un epítipo que está presente en una célula tumoral. Se prefiere particularmente que la unidad estructural de unión a una diana se une específicamente a un epítipo de antígeno asociado con el cáncer definido de células T o células B perteneciente a productos génicos únicos de genes celulares mutados o recombinados, en particular quinasas dependientes de la ciclina (por ejemplo, CDC2, CDK2, CDK4), p15<sup>Ink4b</sup>, p53, AFP,  $\beta$ -catenina, caspasa 8, p53, producto de fusión Bcr-abl, MUM-1 MUM-2, MUM-3, ELF2M, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, RAGE, miosina/m, 707-AP, CDC27/m, ETV6/AML, TEL/Amll, Dekcain, LDLR/FUT, Pml-RARa, TEL/AML1; antígenos del cáncer de testículos (CT), en particular NY-ESO- 1, miembros de la familia MAGE (MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-10, MAGE- 12), BAGE, DAM-6, DAM-10, miembros de la familia GAGE (GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE- 6, GAGE-7B, GAGE- 8), NY-ESO-1, NA-88A, CAG-3, antígeno asociado a RCC G250; antígenos de virus tumorales, en particular oncoproteínas E6 o E7 derivadas del virus del papiloma humano (HPV), virus Epstein Barr EBNA2-6, LMP-1, LMP-2; antígenos de diferenciación específica de tejido o sobreexpresada, en particular gp77, gp100, MART-1/Melan-A, p53, tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa (TRP-1 y TPR-2), PSA, PSM, MC1R ; antígenos ampliamente expresados, en particular ART4, CAMEL, CEA, CypB, EpCAM, HER2/neu, hTERT, hTTRT, ICE, Mucl, Muc2, PRAME RU1, RU2, SART-1, SART-2, SART-3, y WT1; y fragmentos y derivados de los mismos. Los antígenos tumorales particularmente preferidos son antígenos derivados de las proteínas HER-2 y EpCAM.

40 En todas las realizaciones del primer aspecto, la unidad estructural de unión a una diana se selecciona del grupo que consiste en: (i) anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de los mismos; (ii) proteína de tipo anticuerpo; y (iii) aptámero de ácido nucleico. En realizaciones preferidas el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de los mismos se selecciona entre un diacuerpo, un tetracuerpo, un nanocuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo desimmunizado, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En realizaciones preferidas el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, Fv de cadena sencilla, y Fv con enlace disulfuro (dsFv). En realizaciones preferidas el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de los mismos comprende (a) ya sea la forma unida a la membrana de la cadena pesada de huHEA125 (SEQ ID NO: 1) o la forma soluble de la cadena pesada de huHEA125 (SEQ ID NO: 2); y/o (b) la cadena ligera de huHEA125 (SEQ ID NO: 11).

45 En realizaciones preferidas del primer aspecto el conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana comprende (i) un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de los mismos se une específicamente a la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de los mismos comprende: (a) la cadena pesada de huHEA125, en donde la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en: (a1) la forma unida a la membrana de la cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 1, en donde el dominio variable de la cadena pesada de VH como se muestra en SEQ ID NO: 3 comprende entre 0 y 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) intercambios de aminoácidos, entre 0 y 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) deleciones de aminoácidos y/o entre 0 y 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) adiciones de aminoácidos posicionados en las regiones marco de VH, y en donde el dominio constante de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 26 comprende entre 0 y 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) intercambios de aminoácidos, entre 0 y 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) deleciones de aminoácidos y/o entre 0 y 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) adiciones de aminoácidos; y (a2) la forma soluble de la cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 2, en donde el dominio variable de la cadena pesada de VH como se muestra en SEQ ID NO: 3 comprende entre 0 y 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) intercambios de aminoácidos, entre 0 y 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) deleciones de aminoácidos y/o entre 0 y 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) adiciones de



NO: 11). En una realización del primer aspecto, la cadena pesada de huHEA125 y/o la cadena ligera de huHEA125 comprenden cada una de manera independiente entre sí hasta 20 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) intercambios, deleciones, o adiciones de aminoácidos, en donde estos intercambios, deleciones, o adiciones de aminoácidos pueden ser situados en los dominios constantes de la cadena pesada y/o en el dominio constante de la cadena ligera y/o en las regiones marco del dominio variable de la cadena pesada y/o en las regiones marco del dominio variable de la cadena ligera. En una realización particularmente preferida del primer aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo IgG completo que comprende dos cadenas pesadas de huHEA125 (SEQ ID NO: 1) y dos cadenas ligeras de huHEA125 (SEQ ID NO: 11), en donde una cadena pesada está conectada a una cadena ligera a través una unión disulfuro y en donde las cadenas pesadas están conectadas entre sí por uno o dos (preferiblemente dos) enlaces disulfuro.

Dentro de otras realizaciones preferidas del primer aspecto la unidad estructural de unión a una diana comprende la cadena pesada de huHEA125 (forma soluble, SEQ ID NO: 2) y/o la cadena ligera de huHEA125 (SEQ ID NO: 11). En una realización del primer aspecto, la cadena pesada de huHEA125 y/o la cadena ligera de huHEA125 comprenden cada una de manera independiente entre sí hasta 20 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) intercambios, deleciones, o adiciones de aminoácidos, en donde estos intercambios, deleciones, o adiciones de aminoácidos pueden ser situados en los dominios constantes de la cadena pesada y/o en el dominio constante de la cadena ligera y/o en las regiones marco del dominio variable de la cadena pesada y/o en las regiones marco del dominio variable de la cadena ligera. En una realización particularmente preferida del primer aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo IgG completo que comprende dos cadenas pesadas de huHEA125 (SEQ ID NO: 2) y dos cadenas ligeras de huHEA125 (SEQ ID NO: 11), en donde una cadena pesada está conectada a una cadena ligera a través de una unión disulfuro y en donde las cadenas pesadas están conectadas entre sí por uno o dos (preferiblemente dos) enlaces disulfuro.

En un segundo aspecto la presente invención se refiere al conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de acuerdo con el primer aspecto para uso en medicina.

En un tercer aspecto la presente invención se refiere al conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de acuerdo con el primer o el segundo aspecto para el tratamiento del cáncer o una enfermedad autoinmune en un paciente, en donde el cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cáncer pancreático, colangiocarcinoma, cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, tumores cerebrales, tumores en la infancia, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de piel epitelial, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno y en donde la enfermedad autoinmune se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en espondilitis anquilosante, enfermedad de Chagas, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS), enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso sistémico, enfermedad mixta del tejido conectivo, miastenia gravis, narcolepsia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, psoriasis, artritis psoriásica, polimiositis, cirrosis biliar primaria, policondritis reincidente, artritis reumatoide, esquizofrenia, síndrome de Sjögren, arteritis temporal, colitis ulcerativa y vasculitis Granulomatosis de Wegener, en particular artritis reumatoide.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un tipo del conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de acuerdo con el primer aspecto y que comprende además uno o más diluyentes, portadores, excipientes, agentes de carga, aglutinantes, lubricantes, deslizantes, desintegrantes, adsorbentes; y/o conservantes farmacéuticamente aceptables. Se prevé que la composición farmacéutica puede comprender dos o más conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana diferentes. Preferiblemente, las unidades estructurales de unión a una diana se unen a diferentes dianas. En particular en la terapia tumoral se ha reconocido que puede ser ventajoso administrar dos o más unidades estructurales de unión a una diana dirigidos contra dos dianas diferentes en la misma célula tumoral, aumentando así la probabilidad de que todas las células tumorales sean sacrificadas por la administración del terapéutico y disminuyendo la probabilidad de desarrollo de resistencia.

Se prefiere particularmente que la composición farmacéutica del cuarto aspecto se pueda utilizar en forma de medicamentos administrados sistémicamente. Estos incluyen parenterales, que comprenden entre otros inyectables e infusiones. Los inyectables se formulan en forma de ampollas o como inyectables listos para utilizar, por ejemplo, jeringas listas para utilizar o jeringas de un solo uso y aparte de esto en frascos punzantes para retirada múltiple. La administración de inyectables puede estar en forma de aplicación subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) o intracutánea (i.c.). En particular, es posible producir las formulaciones inyectables respectivas apropiadas como una suspensión de cristales, soluciones, sistemas coloidales de nanopartículas o dispersos como, por ejemplo, hidrosoles.

Las formulaciones inyectables se pueden producir adicionalmente como concentrados, que se pueden disolver o dispersar con diluyentes isotónicos acuosos. La infusión también se puede preparar en forma de soluciones isotónicas, emulsiones grasas, formulaciones de liposomas y microemulsiones. Similar a los inyectables, las formulaciones de infusión también pueden prepararse en forma de concentrados para dilución. Las formulaciones inyectables también se

pueden aplicar en forma de infusiones permanentes tanto en terapia intrahospitalaria como en terapia ambulatoria, por ejemplo, por medio de minibombas.

5 Es posible adicionar a las formulaciones farmacéuticas parenterales, por ejemplo, albúmina, plasma, expansor, sustancias con actividad de superficie, diluyentes orgánicos, sustancias que influyen sobre el pH, sustancias complejantes o sustancias poliméricas, en particular como sustancias para influir en la adsorción de los conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la invención a proteínas o polímeros o también se pueden adicionar con el objetivo de reducir la adsorción de los conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la invención a materiales como instrumentos de inyección o materiales de envasado, por ejemplo, plástico o vidrio.

10 Los conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la invención se pueden unir a microportadores o nanopartículas en parenterales como, por ejemplo, a partículas finamente dispersas a base de poli(met)acrilatos, polilactatos, poliglicolatos, poliaminoácidos o poliéter uretanos. Las formulaciones parenterales también se pueden modificar como preparaciones de depósito, por ejemplo, basándose en el "principio de unidad múltiple", si los conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la invención se introducen en forma finamente dispersa, dispersa y suspendida, respectivamente, o como una suspensión de cristales en el medicamento o basándose en el "principio de unidad única" si el conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la invención está encerrado en una formulación, por ejemplo en una tableta o una varilla que se implanta posteriormente. Estos implantes o medicamentos de depósito en formulaciones de unidad única y de unidades múltiples a menudo consisten en los denominados polímeros biodegradables como, por ejemplo, poliésteres de ácido láctico y ácido glicólico, uretanos de poliéter, poliaminoácidos, poli(met)acrilatos o polisacáridos.

20 Los adyuvantes y portadores adicionados durante la producción de las composiciones farmacéuticas de la presente invención formuladas como parenterales son preferiblemente aqua sterilisata (agua esterilizada), sustancias que influyen en el valor del pH como, por ejemplo, ácidos o bases orgánicos o inorgánicos, así como sales de los mismos, sustancias reguladoras para ajustar los valores de pH, sustancias para la isotonización como por ejemplo, cloruro de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, glucosa y fructosa, agentes tensoactivos y surfactantes, respectivamente, y emulsionantes como, por ejemplo, ésteres parciales de ácidos grasos de sorbitanos de polioxietileno (por ejemplo Tween®) o, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de polioxietilenos (por ejemplo, Cremophor®), aceites grasos como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite de ricino, ésteres sintéticos de ácidos grasos como, por ejemplo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y aceite neutro (por ejemplo, Miglyol®) así como adyuvantes poliméricos como, por ejemplo, gelatina, dextrano, polivinilpirrolidona, aditivos que aumentan la solubilidad de solventes orgánicos como, por ejemplo, propilenglicol, etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol o sustancias formadoras de complejos como, por ejemplo, citrato y urea, conservantes como, por ejemplo, éster hidroxipropílico del ácido benzoico y éster metílico, alcohol bencílico, antioxidantes como por ejemplo, sulfito de sodio y estabilizantes como por ejemplo, EDTA.

35 Cuando se formulan las composiciones farmacéuticas de la presente invención como suspensiones en una realización preferida se adicionan agentes espesantes para evitar la fijación de los conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la invención o agentes tensoactivos y polielectrolitos para asegurar la resuspendibilidad de sedimentos y/o agentes formadores de complejos como, por ejemplo, EDTA. También es posible conseguir complejos del ingrediente activo con diversos polímeros. Ejemplos de tales polímeros son polietilenglicol, poliestirol, carboximetilcelulosa, Pluronic® o éster de ácido graso de sorbitol de polietilenglicol. Los conjugados de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la invención también se pueden incorporar en formulaciones líquidas en forma de compuestos de inclusión, por ejemplo, con ciclodextrinas. En realizaciones particulares se pueden adicionar agentes dispersantes como adyuvantes adicionales. Se pueden utilizar para la producción de agentes de andamio liofilizados como manita, dextrano, sacarosa, albúmina humana, lactosa, PVP o variedades de gelatina.

#### Ejemplos

A continuación, la invención se explica con más detalle mediante ejemplos no limitantes:

45 Ejemplo 1: Materiales y métodos

##### 1.1 Anticuerpo quimérico huHEA125

50 Hace varios años, los inventores han establecido una línea celular de hibridoma que secreta el anticuerpo monoclonal de ratón anti-EpCAM HEA125 (Moldenhauer et al., 1987; Momburg et al., 1987). Utilizando técnicas de biología molecular, esta línea de hibridoma se reconstruyó para producir una versión quimérica del anticuerpo que consistía en los dominios variables de ratón conectados a cadena ligera constante kappa humana y cadena pesada constante IgG1 humana. El anticuerpo huHEA125 resultante se une a células que expresan EpCAM con alta afinidad ( $K_d = 2.2 \times 10^{-9}$  M) y alta especificidad. Las secuencias de genes y las secuencias de aminoácidos de la inmunoglobulina huHEA125 se muestran a continuación:

##### Cadena pesada de huHEA125

ES 2 621 104 T3

Cadena pesada de la secuencia de péptidos, forma unida a la membrana (IGHV/IGHD/IGHJ/IGHG1; IGHG 1 está subrayada) (SEQ ID NO: 1):

EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRFWMTWVRQAPGKGLEWIGEINLDSSTI  
NYTPSLKDKFIISRDNAKNTLFLQMSKVRSEDTALYYCSRGISMDYWGQGTSVTVSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWSGALTSGVHTFPAVLQS

SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGLQLDETCAEAQDGELDGLWT  
TITIFISLFLLSVCYSAAVTLFKVKWIFSSVVELKQTLVPEYKNMIGQAP

5 Cadena pesada de la secuencia de péptidos, forma secretada (SEQ ID NO: 2):

EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRFWMTWVRQAPGKGLEWIGEINLDSSTI  
NYTPSLKDKFIISRDNAKNTLFLQMSKVRSEDTALYYCSRGISMDYWGQGTSVTVSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWSGALTSGVHTFPAVLQS  
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de péptidos (IGHV/IGHD/IGHJ = dominio VH; las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 están subrayadas) (SEQ ID NO: 3):

EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRFWMTWVRQAPGKGLEWIGEINLDSSTI  
NYTPSLKDKFIISRDNAKNTLFLQMSKVRSEDTALYYCSRGISMDYWGQGTSVTVSS

10 Secuencia de ácidos nucleicos (anotada de acuerdo con la nomenclatura IMGT, IGHV/IGHD/IGHJ; IGHD subrayada; IGHJ doblemente subrayada):

FR1 (SEQ ID NO: 4):

GAAGTGAAGCTTCTCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAAAC  
TCTCCTGTGCAGCCTCA

CDR1 (SEQ ID NO: 5):

15 GGATTGATTTAGTAGATTCTGG

FR2 (SEQ ID NO: 6):

ATGACTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTAGAATGGATTGGAGAA

CDR2 (SEQ ID NO: 7):

ATTAATCTAGATAGCAGTACGATA

20 FR3 (SEQ ID NO: 8):

**AACTATACGCCATCTCTAAAGGATAAATTCATCATCTCCAGGGACAACGCCAAAAATA  
CGCTGTTCTCTGCAAATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACACAGCCCTTTATTACTGT**

CDR3 (SEQ ID NO: 9):

TCAAGAGGTATTTCTATGGACTAC

FR4 (SEQ ID NO: 10):

5 TGGGGTCAGGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

Cadena ligera de huHEA125

Secuencia de péptidos cadena ligera (IGKV/IGKJ/IGKC; IGKC está subrayada) (SEQ ID NO: 11):

**DILLTQSPAILSSVSPGERVSVFSCRASQSIGISLHWYQQRPSDSPRLLIKYASESISGI  
PSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQSNIWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVF  
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS  
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

10 Secuencia de péptidos (IGKV/IGKJ = dominio VL; las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 están subrayadas) (SEQ ID NO: 12):

**DILLTQSPAILSSVSPGERVSVFSCRASQSIGISLHWYQQRPSDSPRLLIKYASESISGI  
PSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQSNIWPTTFGAGTKLELK**

Secuencia de ácidos nucleicos (anotada de acuerdo con la nomenclatura IMGT, IGKV/IGKJ; IGKV está subrayada; IGKJ está doblemente subrayada):

FR1 (SEQ ID NO: 13):

**GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCA  
GTTTCTCCTGCAGGGCCAGT**

15

CDR1 (SEQ ID NO: 14):

CAGAGCATTGGCATAAGT

FR2 (SEQ ID NO: 15):

TTACTGGTATCAGCAAAGACCAAGTGATTCTCCAAGGCTTCTCATAAAG

20 CDR2 (SEQ ID NO: 16):

TATGCTTCT

FR3 (SEQ ID NO: 17):

**GAGTCAATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTA  
CTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGT**

CDR3 (SEQ ID NO: 18):

25 CAACAAAGTAATATCTGGCCAACCACG

FR4 (SEQ ID NO: 19):

TTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

1.2 Anticuerpo de control Xolair®

El anticuerpo de control Xolair® (Omalizumab, anticuerpo IgG1 humano dirigido contra la inmunoglobulina IgE humana) fue producido por Novartis, Alemania.

1.3 Líneas celulares de carcinoma

- 5 Se utilizaron las siguientes líneas celulares de carcinoma para estudios de inhibición del crecimiento con conjugados huHEA125-amatoxina:

Capan-1	adenocarcinoma pancreático
MCF-7	adenocarcinoma de mama humano (derivado del derrame pleural)
Colo205	metástasis de cáncer de colon
OZ	colangiocarcinoma

Se utilizaron las siguientes líneas celulares de carcinoma para estudios de inhibición del crecimiento o estudios de xenoinjerto de ratón con conjugados de HERCEPTINA-amatoxina:

SKOV-3	carcinoma ovárico
SK-BR-3	adenocarcinoma de mama
NCI-N87	carcinoma gástrico
MDA-MB231	carcinoma de mama

Las células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, EE.UU.).

- 10 1.4 Ejemplo comparativo: Síntesis de derivados de amanitina con un enlazante en el aminoácido 1

1.4.1 Síntesis de di-t-butiloxicarbonil-hexametilendiamina

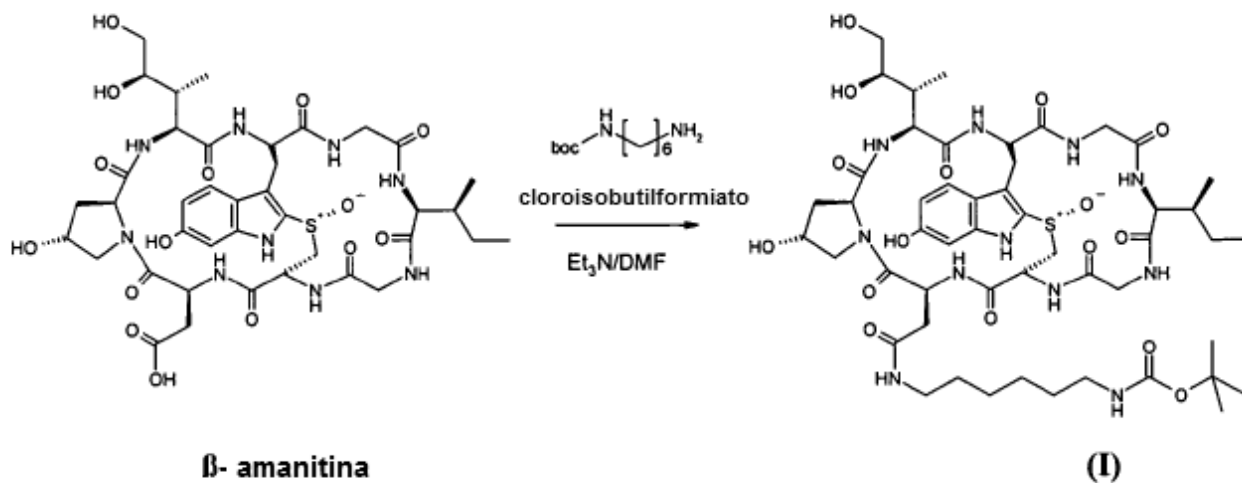
Se disolvieron treinta g de t-butiloxicarbonilazida en 50 mL de 1,4-dioxano y se adicionaron gota a gota a 12 g de hexametildiamina disueltos en 60 mL de 1,4-dioxano a 0°C. Después de 20 horas a RT se adicionó éter dietílico y el precipitado se aisló en un embudo de Büchner. Se recristalizó en metanol/agua.

- 15 1.4.2 Síntesis de clorhidrato de t-Butiloxicarbonil-hexametilendiamina

Se suspendieron 12.9 g de di-t-butiloxicarbonil-hexametilendiamina en 100 mL de éter dietílico que contiene HCl (2N) y se agitó magnéticamente, durante 3h a RT. El precipitado formado se aisló y se lavó a fondo con éter dietílico produciendo una primera fracción del producto. La adición de otros 100 mL de éter dietílico que contiene HCl (2N) produce otra fracción del producto, que es pura después de varios lavados con éter dietílico. Rendimiento ca. 3 g.

- 20 1.4.3 Síntesis de β-Amanitina- (t-butiloxi-carbonil)-hexametildiamida (I)

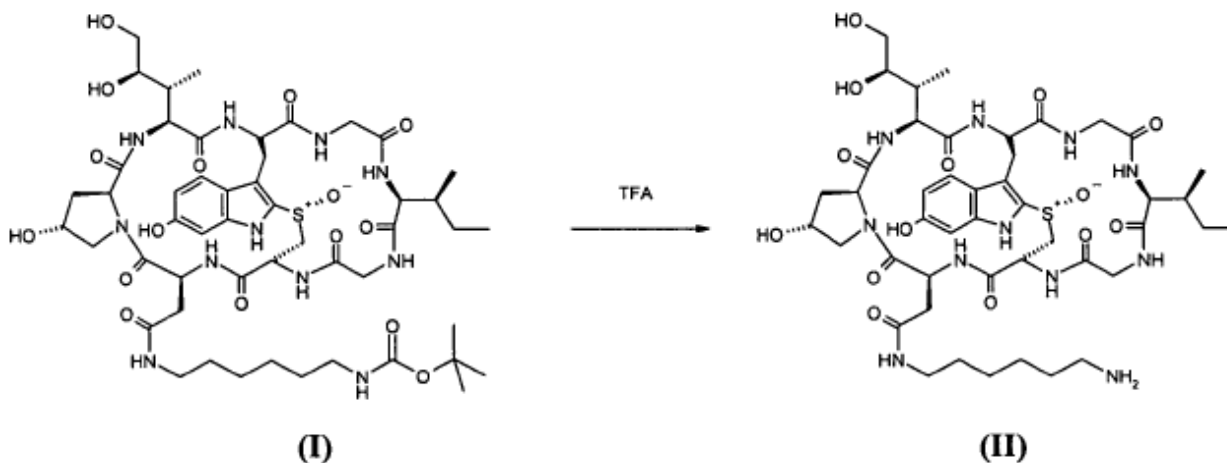




Se disolvieron 20 mg de  $\beta$ -amanitina seca (22  $\mu$ mol) en 0.3 mL de dimetilformamida seca (DMF) y se adicionaron 0.005 mL de trietilamina. Bajo agitación magnética, la mezcla de reacción se enfrió a  $-18^{\circ}\text{C}$  (hielo/NaCl) y después de 10 min se adicionaron 0.164 mL de una mezcla de 0.1 mL de cloroisobutilformiato y 1.0 mL de DMF (110  $\mu$ mol, 5 eq.). Se dejó que la reacción proseguiera durante 20 minutos a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Se disolvieron cincuenta y cinco mg (220  $\mu$ mol, 10 eq.) de clorhidrato de t-butiloxycarbonil-hexametilendiamina y 0.005 mL de trietilamina en 0.3 mL de DMF, se adicionaron a la reacción y se agitaron durante 1 h a RT.

La mezcla de reacción se aplicó a placas de sílica de 4 tlc (20 x 20 cm) y se desarrolló en cloroformo/metanol/agua (65:25:5). El producto se identificó en la luz u.v. ( $R_F = 0.49$ ), se raspa y se extrae con metanol. Rendimiento 11.5 mg. La recuperación de  $\beta$ -amanitina por el mismo procedimiento fue de 7.5 mg.

#### 1.4.4 Síntesis de $\beta$ -Amanitina-hexametilendiamida (II)



Se agitaron 4.54 mg (4.05  $\mu$ moles) de  $\beta$ -amanitina-(t-butiloxycarbonil)-hexametildiamida (I) a temperatura ambiente en 250  $\mu$ L de ácido trifluoroacético. Después de 2 minutos, el TFA en exceso se evaporó a  $20^{\circ}\text{C}$  y el sólido restante se coevaporó 2 veces con 1 mL de acetonitrilo y metanol. La amina en bruto se disolvió en 1000  $\mu$ L de dmsó y se adicionó en un LaPrep-HPLC: columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua (0.05% de TFA), flujo: 26 mL/min, detección a  $\lambda=295$  nm. Solvente A: 95% de agua: 5% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Solvente B: 10% de agua: 90% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min 100% A; 5-20 25 min 0% de A; 25-27 min 100% de A; 27-35 min 100% de A. Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención y se evaporaron los solventes.

4.0 mg (70% de rendimiento) de una espuma de color blanco. MS: 1019 M+H;

#### 1.4.5 Síntesis de $\beta$ -Amanitina-hexametilendiamido-suberoil-HERCEPTIN y $\beta$ -Amanitina-hexametilendiamido-ditio[bis-propionato]-HERCEPTIN

5 Se disolvieron 1.33 mg de  $\beta$ -amanitina-hexametilendiamida (II) en 144  $\mu$ L de DMF seca en tamiz molecular. Se  
 10 Se añadieron respectivamente 16.0  $\mu$ L de solución de DSS (suberato de disuccinimidilo, 3.7 mg de DSS/100  $\mu$ L de DMF)  
 o 16.0  $\mu$ L de solución de DSP (ditiobis(succinimidil) propionato, 3.4 mg de DSP/100  $\mu$ L de DMF) y 3,7  $\mu$ L de trietilamina.  
 La reacción se realizó durante la noche a RT. Los productos de reacción se precipitaron con 2 x 30 mL de éter dietílico  
 seco y se volvieron a solubilizar en 133  $\mu$ L de DMF seca. Se añadieron 133  $\mu$ L de cada solución de DMF a 2.25 mL de  
 solución de HERCEPTIN (2 mg/mL en PBS). La reacción se realizó durante la noche a RT en un agitador rotatorio. El  
 aislamiento de conjugados de anticuerpo  $\beta$ -amanitina-hexametilendiamidosuberoil-HERCEPTIN y  $\beta$ -amanitina-  
 hexametildiamido-suberoil-HERCEPTIN se realizó por separación de componentes macromoleculares sobre una  
 columna de filtración en gel G25.

#### 1.4.6 Síntesis de $\beta$ -Amanitina-hexametilendiamido-suberoil-Xolair

La  $\beta$ -amanitina, conjugada con el anticuerpo de control Xolair (2 mg/mL) se preparó de acuerdo con el conjugado  
 huHEA125. Relación toxina: IgG fue de aproximadamente 1:1.

#### 15 1.4.7 Síntesis de $\beta$ -Amanitina-hexametilendiamido-suberoil-huHEA125

Se trataron 10 mg de (I) (9.0  $\mu$ mol) con 0.2 mL de ácido trifluoroacético durante 2 min a RT. El ácido se separó a vacío y  
 el residuo se disolvió en 0.2 mL de DMF. Después de la adición de 0.010 mL de trietilamina, se añadieron 9.0 mg de  
 disuccinimidilsuberato (DSS) (27  $\mu$ mol) en 0.1 mL de DMF y se hizo reaccionar durante 2.5 h a RT. El producto de  
 reacción se precipitó con éter dietílico, se centrifugó y las pellas se disolvieron en 0.2 mL de DMF. Se añadió la mitad  
 20 de esta solución a 8 mg de huHEA125 en 4 mL de PBS. La mezcla se hizo girar lentamente durante 16 h a 5°C y el  
 conjugado toxina-anticuerpo se separó de la amanitina sin reaccionar y N-hidroxi-succinimida en una columna  
 Sephadex G25 (100 x 2 cm) desarrollada con PBS.

#### 1.4.8 Síntesis del éster de $\beta$ -Amanitina-N-hidroxisuccinimida (I)

Se disolvieron 10 mg de  $\beta$ -amanitina seca (11  $\mu$ mol) en 0.1 mL de dimetilformamida seca (DMF). A esta solución se  
 25 añadieron 8 mg de N-hidroxisuccinimida (70  $\mu$ mol) en 0.02 mL de DMF, seguido de 4 mg de dicitohexilcarbodiimida  
 (20  $\mu$ mol) en 0.02 mL de DMF. La mezcla se dejó reaccionar durante 16 h a RT, y la solución se separó de  
 dicitohexilurea cristalizada. Se precipitó éster de  $\beta$ -amanitina-N-hidroxisuccinimida mediante la adición de 10 mL de  
 éter dietílico y el precipitado se aisló por centrifugación. Las pellas se maceraron con otros 10 mL de éter y se centrifugó  
 de nuevo. La purificación no era necesaria, porque la siguiente etapa permitía la separación y recuperación de la  $\beta$ -  
 30 amanitina sin reaccionar.

#### 1.4.9 Síntesis de $\beta$ -Amanitina-huHEA125 (huHEA125-Amanitina1)

El precipitado de (I) se disolvió en 0.2 mL de DMF, se añadió a 4 mL de huHEA125 (2 mg/mL) en PBS y se hizo girar  
 lentamente durante la noche a 5°C. Aplicada a una columna Sephadex G25 (100 x 2 cm) desarrollada con PBS, el  
 producto de reacción se separó de la  $\beta$ -amanitina sin reaccionar, y N-hidroxisuccinimida. La carga de toxina fue ca. 1  
 Amanitina por molécula de IgG.  
 35

### 1.5 Ejemplo comparativo: Síntesis de conjugado de Amanitina huHEA con un enlazante en el aminoácido 4

#### 1.5.1 Síntesis de $\alpha$ -Amanitina-6'-(t-butil-acetato) (I)

Se disolvieron 20 mg de  $\alpha$ -amanitina (22  $\mu$ mol) en 0.4 mL de dimetilformamida seca (DMF), y se añadieron 1.5 eq. (33  
 40  $\mu$ mol) de etilato de sodio 0.5 M bajo agitación magnética. Inmediatamente, se añadieron 18  $\mu$ L (5.5 eq., 120  $\mu$ mol, 23.4  
 mg, d = 1.3) de bromoacetato de t-butilo (peso molecular medio 195) y se dejó reaccionar durante 10 minutos. La  
 mezcla de reacción se aplicó a 2 placas de tlc de sílica (20 cm x 20 cm, Merck HF254) y se desarrolló en  
 cloroformo/metanol/agua (65:25:4). El producto ( $R_f$  = 0.41) se detectó en luz u.v., se raspa y se eluye con metanol.  
 Rendimiento: 55%.

#### 1.5.2 Síntesis de $\alpha$ -Amanitina-6'-acetil-(t-butiloxycarbonil)-etilen diamida (II)

45 Se hicieron reaccionar cinco mg (5  $\mu$ mol) de (I) con 0.2 mL de ácido trifluoroacético durante 2 min, y el ácido se eliminó  
 a vacío. El residuo se disolvió en 0.2 mL de DMF y se añadieron 0.005 mL de trietilamina. Bajo agitación magnética, la  
 solución se llevó a -18°C (hielo/NaCl) y se añadieron 3.4 mg (25  $\mu$ mol, 5 equivalentes) de cloroforniato de isobutilo. Se  
 dejó que la reacción prosiguiera a -18°C, durante 20 minutos y se añadieron 9.8 mg (50  $\mu$ mol, 10 eq.) de clorhidrato de  
 t-butiloxycarbonil-etilendiamina disueltos en 0.1 mL de DMF y 0.006 mL de trietilamina. La mezcla de reacción se agitó

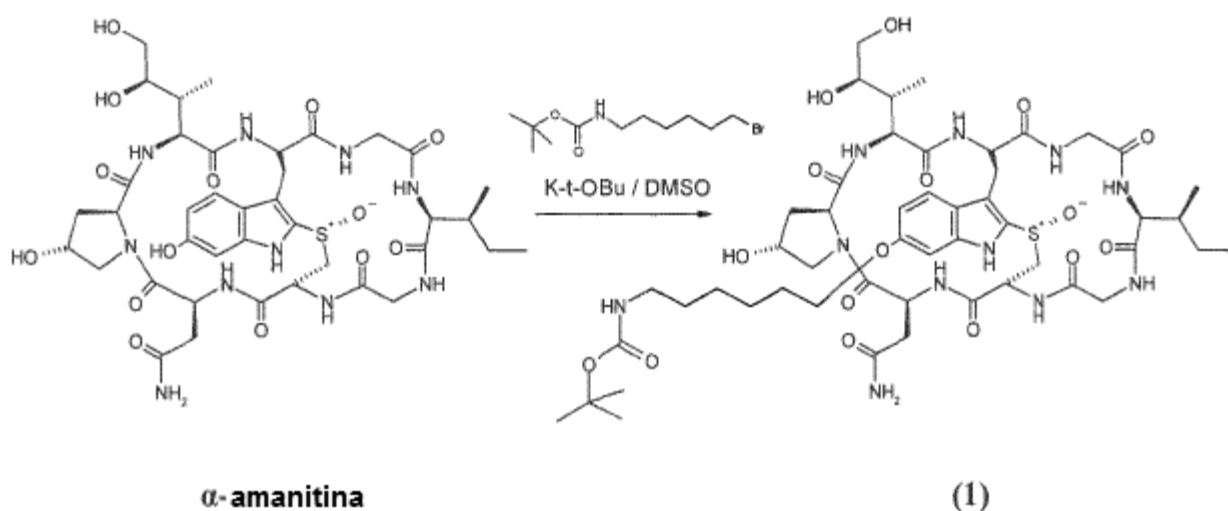
durante 1 hora a RT. El producto se precipitó con éter dietílico seco y el residuo se desarrolló sobre una placa de tlc de sílica como se ha descrito anteriormente. ( $R_F = 0.28$ ). Rendimiento: 85%.

### 1.5.3 Síntesis de $\alpha$ -Amanitina-6'-acetiletilen-diamido-suberoil-huHEA125 (huHEA125-Amanitina4)

5 Se disolvieron cuatro mg (3.6  $\mu$ mol) de (II) en 0.2 mL de ácido trifluoroacético durante 2 min y se evaporó a vacío. El residuo se disolvió en 0.2 mL de DMF seca, se adicionaron 0.005 mL de trietilamina y se hizo reaccionar con 3 mg (8.2  $\mu$ mol, 2.3 equivalentes) de suberato de disuccinimidilo (DSS) bajo agitación magnética durante 2.5 h a RT. El derivado de amanitina se precipitó con éter dietílico seco, se centrifugó, se maceró nuevamente con éter y se centrifugó. Se disolvió en 0.15 mL de DMF, se adicionó a 5 mL de huHEA125 (2 mg/mL) en PBS y se hizo girar lentamente durante la noche a 5°C. Desarrollado en una columna Sephadex G25 (100 x 2 cm) con PBS, el conjugado de la amanitina del anticuerpo se separó del derivado y subproductos de amanitina sin reaccionar. La relación de toxina: anticuerpo fue de 3.0.

### 1.6 Ejemplo comparativo: Síntesis de conjugados de Amanitina Herceptin con un enlazante en el aminoácido 4

#### 1.6.1 Síntesis de 6'-O-(NH-boc-6-aminohexil)- $\alpha$ -amanitina (1)

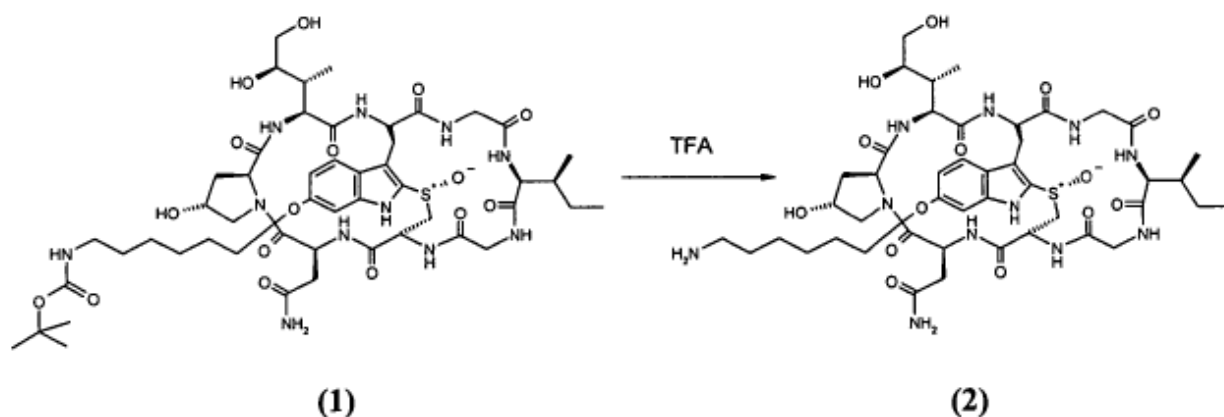


15 Bajo argón se disolvieron 30.00 mg (32.6  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina seca al vacío en 1000  $\mu$ L de dimetilsulfóxido seco (DMSO). Se adicionaron 73.18 mg (261.2  $\mu$ L, 6 eq.) de bromuro de NH-boc-aminohexilo (Fluka 89171) y 3.66 mg (32.6  $\mu$ mol) de tert-butilato de potasio. Después de 90 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se acidificó a pH = 4 con ácido acético y se diluyó con 40 mL de éter dietílico. El sólido se recogió y se recogió en 1000  $\mu$ L de metanol. La solución en metanol se diluyó con 1000  $\mu$ L de agua. La solución se purificó en una LaPrep-HPLC: columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua (TFA al 0.05%), flujo: 26 mL/min, detección a  $\lambda = 295$  nm.

20 Solvente A: 95% de agua: 5% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Solvente B: 10% de agua: 90% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min 100% de A; 5-20 min 0% de A; 20-25 min 0% de A; 25-27 min 100% de A; 27-30 min 100% de A. Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención y se evaporaron los solventes.

25 9.9 mg (27% de rendimiento) de un polvo de color blanco. MS: 1118 M+H; 1140 M+Na<sup>+</sup>

#### 1.6.2 Síntesis de 6'-O-(-6-aminohexil)- $\alpha$ -amanitina (2)



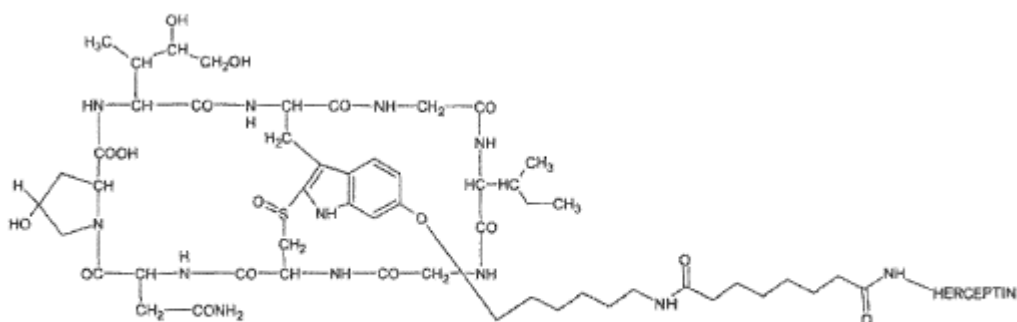
5 Se disolvieron 9.90 mg (8.85  $\mu\text{mol}$ ) de 6'-(-NH-boc-6-aminohexil)- $\alpha$ -amanitina (compuesto (1)) en 250  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción se agitó bajo argón a temperatura ambiente. Después de 2 minutos se eliminó el ácido a vacío a 20°C y el residuo se secó. El éter de  $\alpha$ -amanitina en bruto se purificó en una LaPrep-HPLC: columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu\text{m}$ , 250 x 20 mm, con metanol/agua (0.05% de TFA), flujo: 26 mL/min, detección a  $\lambda = 295 \text{ nm}$ . Solvente A: 95% de agua: 5% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Solvente B: 10% de agua: 90% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min 100% de A; 5-25 min 50% de A; 25-30 min 0% de A; 30-35 min 0% de A; 35-40 min 100% de A, 40-45 min 100% de A. Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención y se evaporaron los solventes.

10 9.10mg (99% de rendimiento) de un polvo de color blanco. MS: 1019 M+H<sup>+</sup>; 1041 M+Na<sup>+</sup>

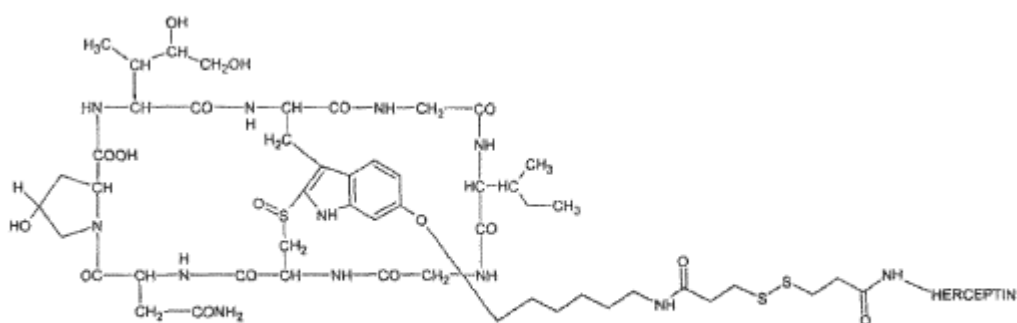
#### 1.6.3 Síntesis de conjugados de $\alpha$ -amanitina-Herceptin (3) y (4)

15 Se disolvieron 2.0 mg del compuesto (2) en 113  $\mu\text{L}$  de DMF seca en tamiz molecular. Se adicionaron respectivamente 21.8  $\mu\text{L}$  de solución de DSS (suberato de disuccinimidilo, 3.7 mg de DSS/100  $\mu\text{L}$  de DMF) o 23.9  $\mu\text{L}$  de solución de DSP (ditiobis(succinimidilo) propionato; 3.7 mg de DSP/100  $\mu\text{L}$  de DMF) y 5.7  $\mu\text{L}$  de trietilamina. La reacción se realizó durante la noche a RT. Los productos de reacción se precipitaron con 2 x 30 mL de éter dietílico seco y se volvieron a solubilizar en 200  $\mu\text{L}$  de DMF seca. Se adicionaron 59  $\mu\text{L}$  (DSS) o 173  $\mu\text{L}$  (DSP) de las soluciones de DMF a 6.0 mL de solución de anticuerpo (2 mg/mL en PBS). La reacción se realizó durante la noche a RT en un agitador rotatorio. El aislamiento de los conjugados de anticuerpo (3) y (4) se realizó por separación de componentes macromoleculares sobre una columna de filtración en gel G25.

20



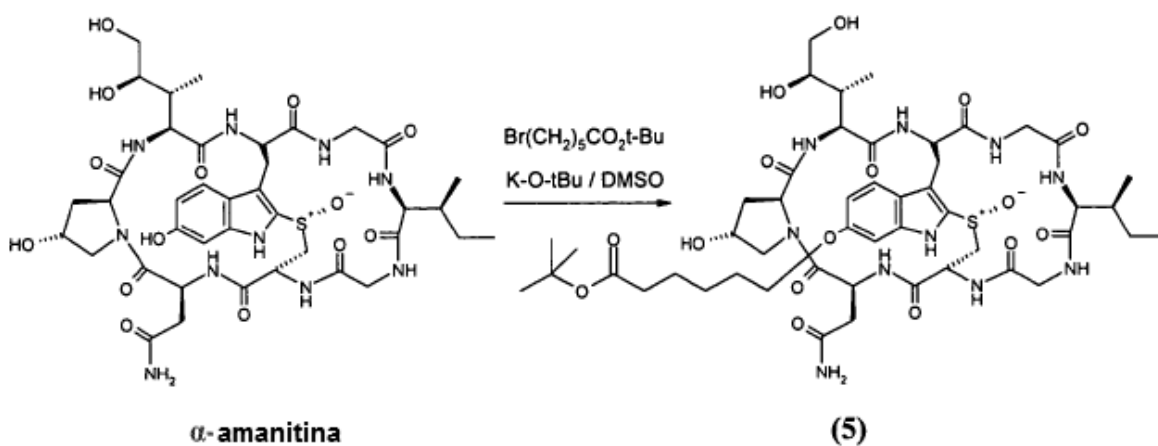
(3)



(4)

1.7 Ejemplo comparativo: Síntesis de conjugados de Amanitina Herceptin con un enlazante en el aminoácido 4

1.7.1 Síntesis de 6'-O- (5-O-*t*-butil-carboxipentil)- $\alpha$ -amanitina (5)

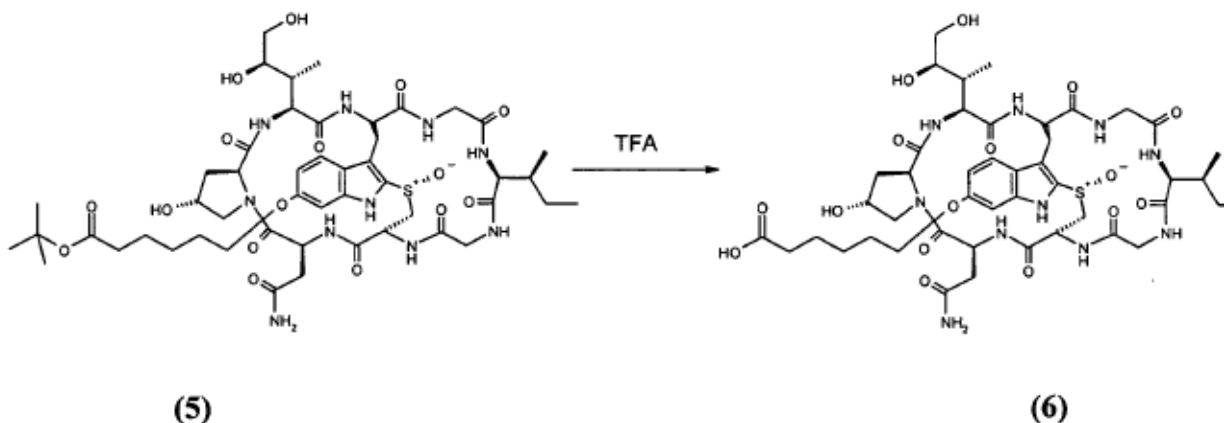


- 5 Bajo argón se disolvieron 17.07 mg (18.6  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina seca al vacío en 1000  $\mu$ L de dimetilsulfóxido seco (DMSO). Se adicionaron de una vez 60.1  $\mu$ L (18.6  $\mu$ mol, 1 eq.) de tert-butanolato de potasio en forma de una solución 3.09 M en DMSO. Después de la adición de la base se adicionaron 38  $\mu$ L (148.6  $\mu$ mol) de éster tert-butilico del ácido 6-bromoheptanoico. La mezcla de reacción se agitó durante 8 horas. Después de 8, 11, 23, 34, 50 y 52h se adicionaron cantidades adicionales de tert-butanolato de potasio (60.1  $\mu$ L) y éster tert-butilico del ácido 6-bromoheptanoico (38  $\mu$ L).
- 10 Después de 56 h, la mezcla de reacción se inactivó con 100  $\mu$ L de una solución 0.3 M de ácido acético en DMSO. Los volátiles de la mezcla de reacción se eliminaron a 40 °C y 8 mbar. El éter de amanitina en bruto se purificó en una LaPrep-HPLC: columna: Kromasil 100-C<sub>18</sub>, 10  $\mu$ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua (TFA al 0.05%), flujo: 26 mL/min, detección a  $\lambda = 295$  nm. Solvente A: 95% de agua: 5% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Solvente B: 10% de agua: 90% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min 100% de A; 5-20 min 0% de A; 20-25 min 0%

de A; 25-27 min 100% de A; 27-35 min 100% de A. Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención (20.2 min) y se evaporó el solvente.

17.88 mg (53% de rendimiento) de un polvo de color blanco. MS: 1089 M+H<sup>+</sup>; 1111 M+Na<sup>+</sup>

### 1.7.2 Síntesis de 6'-O-(carboxipentil)- $\alpha$ -amanitina (6)



5

Se disolvieron 14.84 mg (13.64 mmol) de 6'-(-carboxipentil)- $\alpha$ -amanitina (compuesto (5)) en atmósfera de argón en 250  $\mu$ L de ácido trifluoroacético (TFA). La mezcla de reacción se agitó durante 2 minutos y se evaporó hasta sequedad a 20°C. El residuo se coevaporó 2 veces con 1 mL de metanol. El sólido restante se purificó en una LaPrep-HPLC: columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua (0.05% de TFA), flujo: 26 mL/min, detección a  $\lambda$  = 295 nm. Solvente A: 95% de agua: 5% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Solvente B: 10% de agua: 90% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min 100% de A; 5-20 min 0% de A; 20-40 min. 0% de A. Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención y se evaporaron.

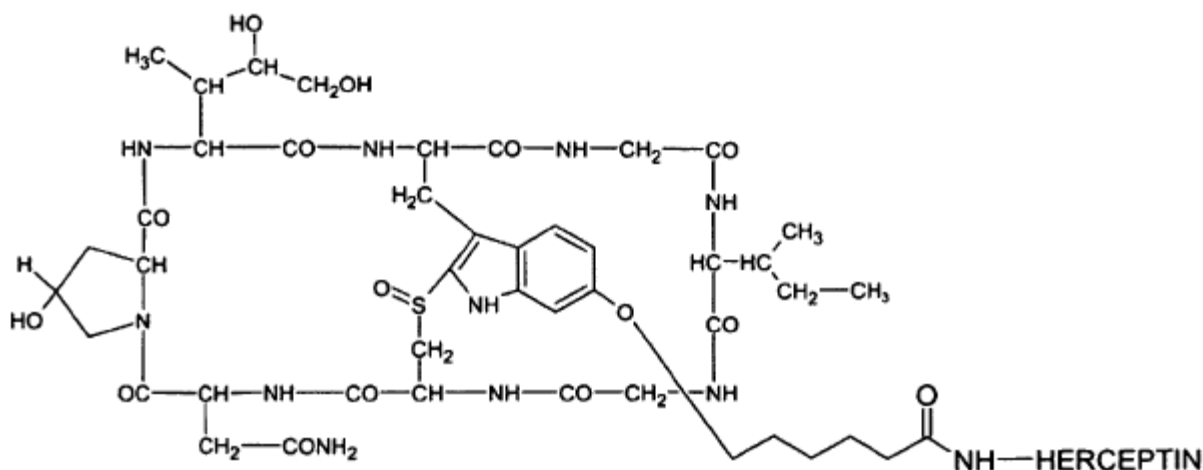
10

7.05 mg (50% de rendimiento) de un polvo de color blanco. MS: 1033 M+H<sup>+</sup>; 1056 M+Na<sup>+</sup>

### 1.7.3 Síntesis del conjugado (7) de $\alpha$ -amanitina-Herceptin

Se disolvieron 10.0 mg del compuesto (6) en 100  $\mu$ L de DMF seca en tamiz molecular. Se adicionaron 80.0  $\mu$ L de solución de N-hidroxisuccinimida (7.4 mg de N-OH-Succ/80  $\mu$ L de DMF) y 80.0  $\mu$ L de solución de DCCi (N,N-diciclohexilcarbodimida; 3.4 mg de DCCi/80  $\mu$ L de DMF). La reacción se realizó durante la noche a RT. El producto de reacción se precipitó con 2 x 30 mL de éter dietílico seco y se solubiliza de nuevo en 800  $\mu$ L de DMF seca. Se adicionaron 266  $\mu$ L de la solución de DMF a 5.0 mL de solución de anticuerpo (6 mg/mL en PBS). La reacción se realizó durante la noche a RT en un agitador rotatorio. El aislamiento del anticuerpo conjugado (7) se realizó por separación de componentes macromoleculares sobre una columna de filtración en gel G25.

20



## 1.8 Síntesis de conjugado de Amanitina huHEA con un enlazante en el aminoácido 3

1.8.1 Síntesis de  $\alpha$ -Amanitina-glutarato

Se disolvieron 3.0 mg (3.3  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina, se secó al vacío sobre  $P_4O_{10}$  en 0.25 mL de piridina seca y se hizo reaccionar con 0.9 mg (79  $\mu$ mol) de anhídrido glutárico en 0.1 mL de piridina, durante 24 horas a RT en la oscuridad. El péptido se precipitó por adición de 7 mL de éter dietílico seco, se centrifugó y el sólido se lavó una segunda vez con éter dietílico y se centrifugó.

A través de esta reacción se obtiene un derivado de  $\alpha$ -amanitina en donde  $R_1 = -OH$  (en la figura 1) se reemplaza por  $R_1 = -O-C(O)-(CH_2)_3-COOH$ .

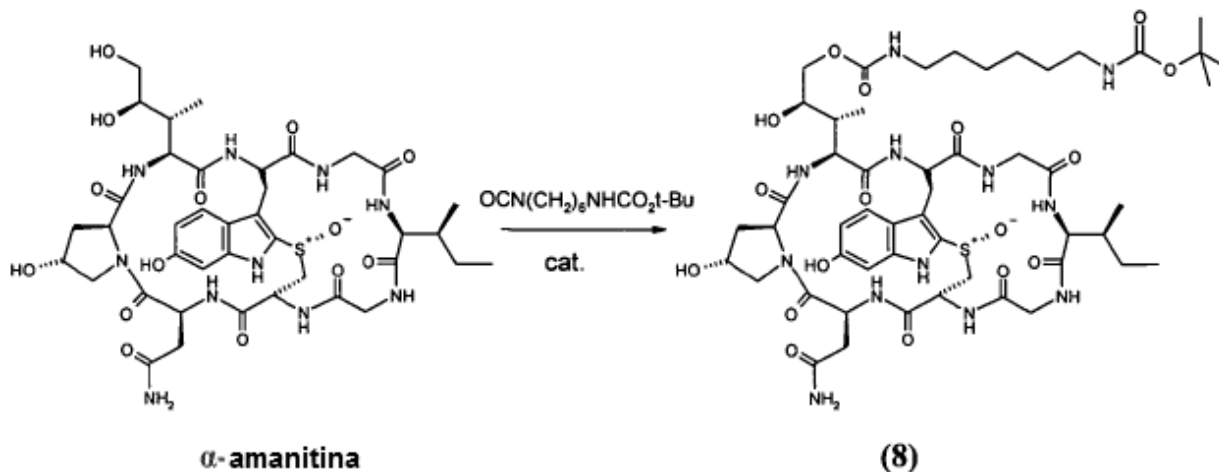
1.8.2 Síntesis de N-hidroxisuccinimidato del ácido  $\alpha$ -Amanitina-glutarico

Se disolvieron 3.4 mg de glutarato de  $\alpha$ -amanitina (3.3  $\mu$ mol) en 0.05 mL de dimetilformamida seca (DMF), y se adicionaron 2.4 mg (7 eq.) de N-hidroxi-succinimida disueltos en 0.01 mL de DMF. Después de la adición de 1.2 mg de diciclohexilcarbodiimida en 0.01 mL de DMF, se dejó continuar la reacción durante 16 h a RT. La solución se separó de los cristales formados y el péptido precipitó por la adición de 4 mL de éter dietílico seco. Después de la centrifugación, las pellas se lavaron con otros 4 mL de éter y se centrifugó. El sólido se disolvió en 0.1 mL de dimetilformamida y se usó inmediatamente para la reacción con la solución de anticuerpo.

1.8.3 Síntesis de  $\alpha$ -Amanitina-glutarato-huHEA125 (huHEA125-Amanitina3)

Se adicionaron 0.1 mL de la solución de 3.0 mg de N-hidroxisuccinimidato del ácido  $\alpha$ -amanitina-glutarico a 10 mg de anticuerpo hu-HEA125 en 5 mL de PBS y se hizo reaccionar bajo rotación lenta a 5°C en la oscuridad. Después de 16 h, la solución se aplicó a una columna Sephadex G25 (120 x 1.5 cm) equilibrada con PBS, y se recogió la fracción de proteína. La carga de la amanitina se determinó espectrofotométricamente a partir de la diferencia de absorción a 310 nm de la solución de proteína frente a un blanco que contenía la misma concentración del anticuerpo nativo, utilizando el coeficiente de extinción molar de las amatoxinas de 13.500  $cm^{-1} \cdot M^{-1}$ . La relación  $\alpha$ -amanitina: IgG de esta preparación fue ca. 8.

## 1.9 Síntesis de conjugados de Amanitina Herceptin con un enlazante en el aminoácido 3

1.9.1 Síntesis de  $\delta$ -O- (NH-boc-6-aminohexilcarbamoil) - $\alpha$ -amanitina (8)

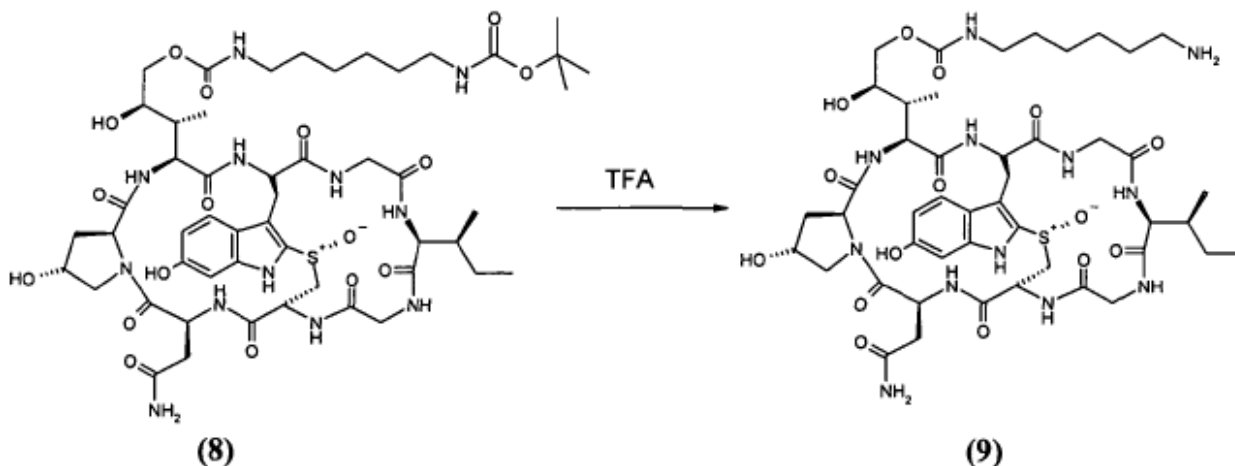
cat.: dilauril estannato de dibutilo  $n\text{-bu}_2\text{Sn}[\text{OCO}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3]_2$

Bajo argón se disolvieron 13.43 mg (14.6  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina seca al vacío en 1000  $\mu$ L de dimetil formamida seca (DMF). Se adicionaron 7.08 mg (29.2  $\mu$ mol) de NH-Boc-6-isocianato aminohexano y 18.46 mg (29.2  $\mu$ mol) de dilaurilestanato de di-butilo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 23 horas se adicionaron 13.43 mg adicionales (14.6  $\mu$ mol) de NH-Boc-6-isocianatoaminohexano. Después de 52 horas, la mezcla de reacción se hidrolizó con 200  $\mu$ L de metanol y se evaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en 1200  $\mu$ L de DMSO y se purificó en una LaPrep-HPLC: columna: Kromasil 100-C<sub>18</sub>, 10  $\mu$ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua (TFA al 0.05%), flujo: 26 mL/min, detección a  $\lambda = 295$  nm. Solvente A: 95% de agua: 5% de metanol. Solvente B: 5% de agua: 95% de

metanol. Gradiente: 0-5 min 100% de A; 5-20 min 0% de A; 20-25 min 0% de A; 25-27 min 100% de A; 27-35 min 100% de A. Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención y se evaporaron los solventes.

9.06 mg (53% de rendimiento) de un sólido blanco. MS: 1161 M+H<sup>+</sup>; 1183 M

### 1.9.2 Síntesis de $\delta$ -O-(6-aminohexilcarbamoil) - $\alpha$ -amanitina (9)



5

Se disolvieron 9.06 mg (7.8  $\mu$ mol) del compuesto (8) en 250  $\mu$ L de ácido trifluoroacético y se agitó durante 2 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad y el residuo se coevaporó por 2 veces con 1.5 mL de acetonitrilo. El sólido se purificó en una LaPrep-HPLC: columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 x 20 mm, con acetonitrilo/agua, flujo: 26 mL/min, detección a  $\lambda = 295$  nm. Solvente A: 95% de agua: 5% de acetonitrilo. Solvente B: 5% de agua: 95% de acetonitrilo. Gradiente: 0-5 min 100% de A; 5-20 min 0% de A; 20-25 min 0% de A; 25-27 min 100% de A; 27-35 min 100% de A. Las fracciones con el tiempo de retención entre 12-17 min se recogieron y se evaporaron hasta un sólido blanco.

10

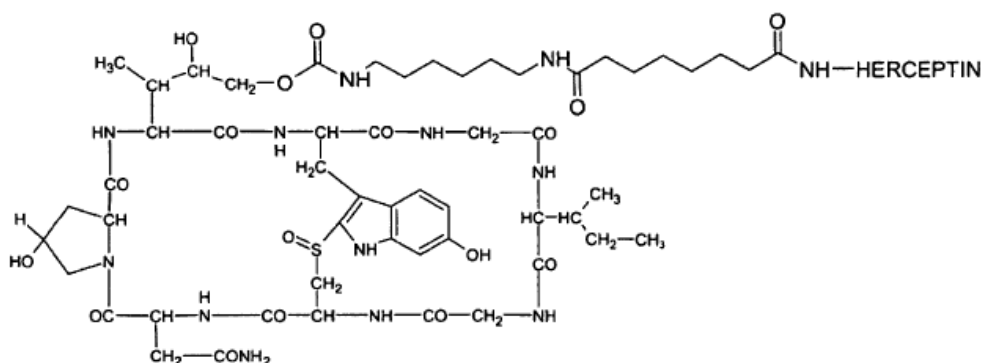
8.75 mg (95% de rendimiento). MS: 1061 M+H<sup>+</sup>; 1083 M+Na<sup>+</sup>

### 1.9.3 Síntesis de conjugados de $\alpha$ -amanitina-Herceptin

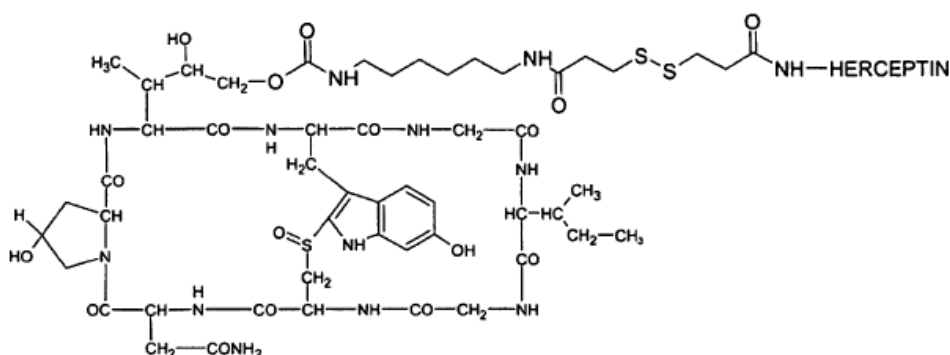
Se disolvieron 2.0 mg del compuesto (9) en 113  $\mu$ L de DMF seca en tamiz molecular. Se adicionaron respectivamente 21.8  $\mu$ L de solución de DSS (suberato de disuccinimidilo, 3.7 mg de DSS/100  $\mu$ L de DMF) o 23.9  $\mu$ L de solución de DSP (ditiobis(succinimidil) propionato, 3.7 mg de DSP/100  $\mu$ L de DMF) y 5.7  $\mu$ L de trietilamina. La reacción se realizó durante la noche a RT. Los productos de reacción se precipitaron con 2 x 30 mL de éter dietílico seco y se volvieron a solubilizar en 200  $\mu$ L de DMF seca. Se adicionaron 122  $\mu$ L (DSS) o 176  $\mu$ L (DSP) de las soluciones de DMF a 6.0 mL de una solución de anticuerpo Herceptin específico de Her-2 (2 mg/mL en PBS). La reacción se realizó durante la noche a RT en un agitador rotatorio. El aislamiento del conjugado de anticuerpo (10) y (11), respectivamente, se realizó por separación de componentes macromoleculares sobre una columna de filtración en gel G25.

20





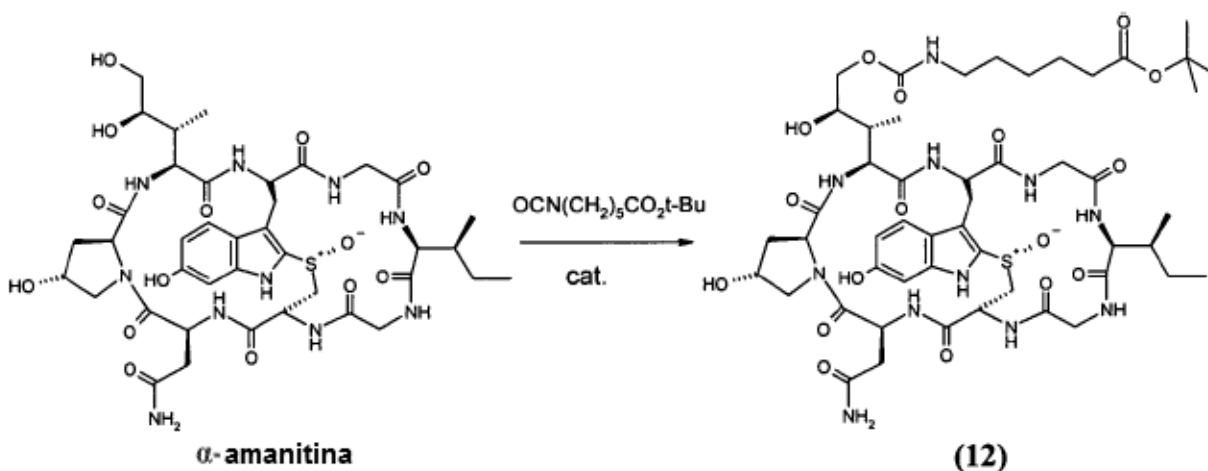
(10)



(11)

### 1.10 Síntesis de conjugados de Amanitina Herceptin con un enlazante en el aminoácido 3

#### 1.10.1 Síntesis de $\delta$ -O-(5-O-t-butil-carboxipentilcarbamoil)- $\alpha$ -amanitina (12)



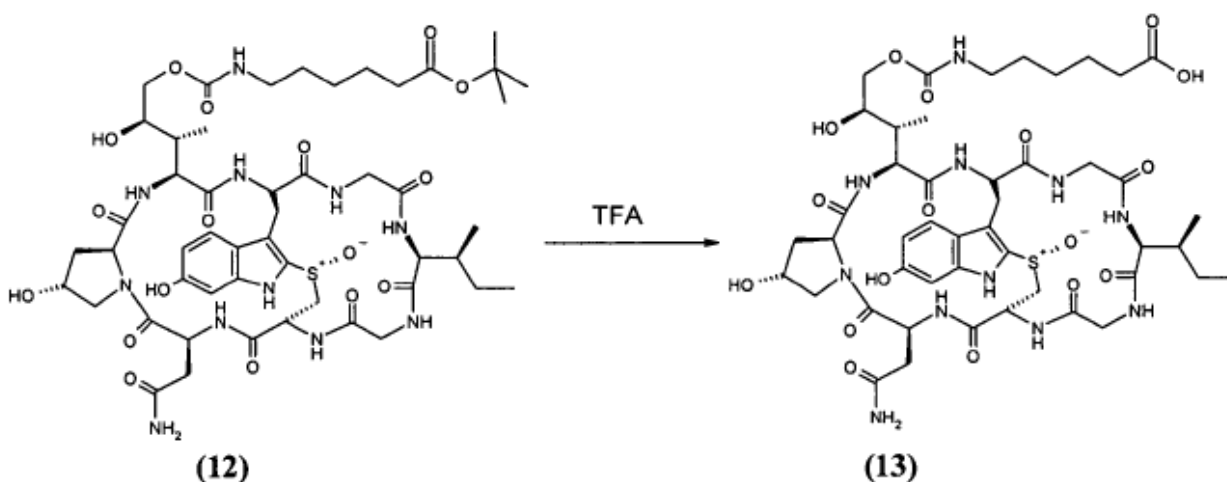
5 cat.: dilauril estannato de dibutilo  $n\text{-bu}_2\text{Sn}[\text{OCO}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3]_2$

Bajo argón se disolvieron 30.76 mg (33.5  $\mu\text{mol}$ ) de  $\alpha$ -amanitina al vacío en 1000  $\mu\text{L}$  de dimetilformamida seca (DMF). Se adicionaron 14.28 mg (13.83  $\mu\text{L}$ , 66.9  $\mu\text{mol}$ ) de éster tert-butilico del ácido isocianatoheptanoico y 42.28 mg (40.26  $\mu\text{L}$ , 66.9  $\mu\text{mol}$ ) de dilauril estannato de dibutilo. Después de 23 horas de agitación a temperatura ambiente se adicionó isocianato éster adicional (13.83  $\mu\text{L}$ ) y la mezcla de reacción se inactivó con metanol después de 33 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el sólido restante se disolvió en DMSO y se purificó en una LaPrep-HPLC: columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu\text{m}$ , 250 x 20 mm, con metanol/agua (0.05% de TFA), flujo: 26 mL/Min, detección a  $\lambda =$

295 nm. Solvente A: 95% de agua: 5% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Solvente B: 10% de agua: 90% de metanol 0.05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min 100% de A; 5-20 min 0% de A; 20-25 min 0% de A; 25-27 min 100% de A; 27-35 min 100% de A. Se recogieron las fracciones con el tiempo de retención de la venta y se evaporaron los solventes.

5 17.95 mg (47% de rendimiento) de un polvo. MS: 1133 M+H<sup>+</sup>; 1155 M+Na<sup>+</sup>

#### 1.10.2 Síntesis de $\delta$ -O-(carboxipentilcarbamoil)- $\alpha$ -amanitina (13)

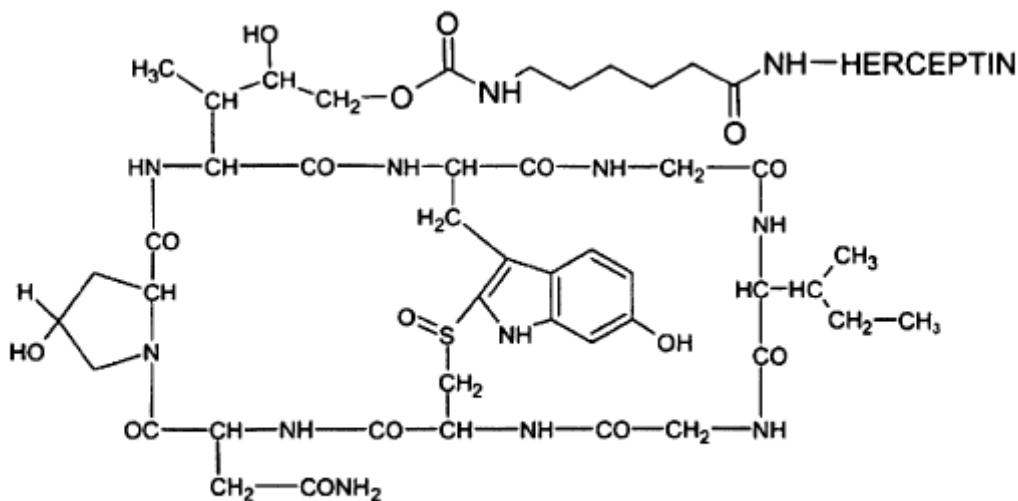


10 Se disolvieron 17.95 mg (15.9  $\mu$ mol) de éster tert-butílico (Compuesto (12)) en 500  $\mu$ L de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El exceso de ácido trifluoroacético se eliminó en vacío y el sólido restante se coevaporó dos veces con 1.5 mL de acetonitrilo. Se purificó el derivado carboxílico libre (13) en una LaPrep-HPLC: columna: Kromasil 100-C<sub>18</sub>, d = 10 mm, 10  $\mu$ m, 250 x 20 mm, con acetonitrilo/agua, flujo: 26 mL/min, detección a  $\lambda$  = 295 nm. Solvente A: 95% de agua: 5% de acetonitrilo. Solvente B: 5% de agua: 95% de acetonitrilo. Gradiente: 0-5 min 100% de A; 5-20 min 0% de A; 20-25 min 0% de A; 25-27 min 100% de A; 27-35 min 100% de A. Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención 12-17 min y se evaporaron los solventes.

15 11.34 mg (66% de rendimiento) de un sólido de color blanco. MS: 1076 M+H<sup>+</sup>; 1098 M+Na<sup>+</sup>

#### 1.10.3 Síntesis de conjugado de Herceptin- $\alpha$ -amanitina

20 Se disolvieron 10.0 mg del compuesto HDP (13) en 100  $\mu$ L de DMF seca en tamiz molecular. Se adicionaron 80.0  $\mu$ L de solución de N-hidroxisuccinimida (7.4 mg de N-OH-Succ/80  $\mu$ L de DMF) y 80.0  $\mu$ L de solución de DCCi (N,N-diciclohexilcarbodimida, 3.4 mg DCCi/80  $\mu$ L de DMF). La reacción se realizó durante la noche a RT. El producto de reacción se precipitó con 2 x 30 mL de éter dietílico seco y se solubiliza de nuevo en 800  $\mu$ L de DMF seca. Se adicionaron 266  $\mu$ L de la solución de DMF a 5.0 mL de solución de anticuerpo (6 mg/mL en PBS). La reacción se realizó durante la noche a RT en un agitador rotatorio. El aislamiento del anticuerpo conjugado (14) se realizó por separación de componentes macromoleculares sobre una columna de filtración en gel G25.



(14)

### 1.11 Síntesis de conjugados de Amanitina Herceptin con un enlazante en el aminoácido 3

#### 1.11.1 Síntesis de $\alpha$ -Amanitina-glutarato

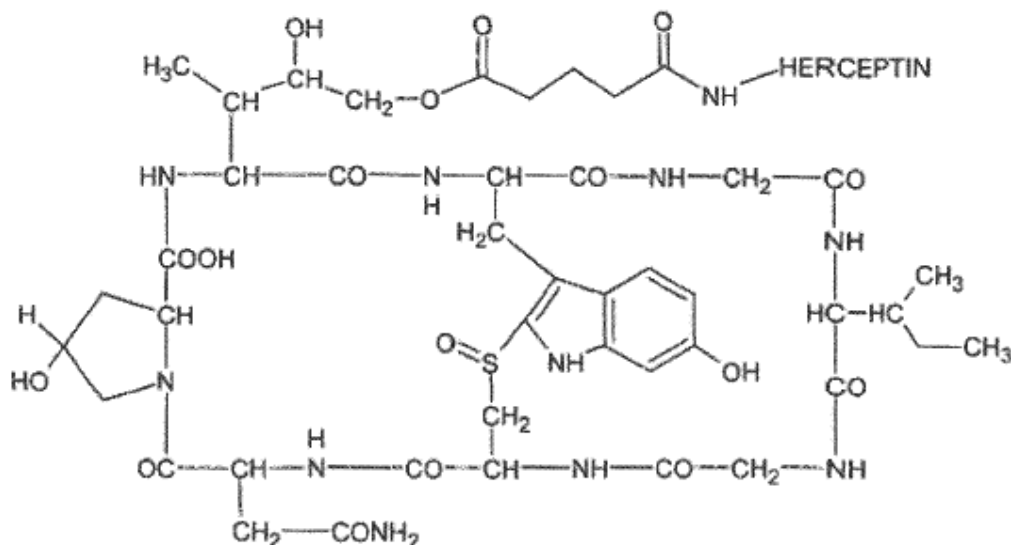
- 5 Se disolvieron 3.0 mg (3.3  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina, se secó al vacío sobre  $P_4O_{10}$  en 0.25 mL de piridina seca y se hizo reaccionar con 0.9 mg (79  $\mu$ mol) de anhídrido glutárico en 0.1 mL de piridina durante 24 horas a RT en la oscuridad. El péptido se precipitó por adición de 7 mL de éter dietílico seco, se centrifugó y el sólido se lavó una segunda vez con éter dietílico y se centrifugó. Mediante esta reacción se obtiene un derivado de  $\alpha$ -amanitina en donde  $R_1 = -OH$  (en la figura 1) se reemplaza por  $R_1 = -O-C(O)-(CH_2)_3-COOH$ .

#### 1.11.2 Síntesis de N-hidroxisuccinimidato del ácido $\alpha$ -Amanitina-glutárico

- 10 Se disolvieron 3.4 mg de glutarato de  $\alpha$ -amanitina (3.3  $\mu$ mol) en 0.05 mL de dimetilformamida seca (DMF), y se adicionaron 2.4 mg (7 eq.) de N-hidroxi-succinimida disueltos en 0.01 mL de DMF. Después de la adición de 1.2 mg de dicitohexilcarbodiimida en 0.01 mL de DMF, se dejó continuar la reacción durante 16 h a RT. La solución se separó de los cristales formados y el péptido se precipitó por la adición de 4 mL de éter dietílico seco. Después de la centrifugación, las pellas se lavaron con otros 4 mL de éter y se centrifugaron. El sólido se disolvió en 0.1 mL de dimetilformamida y se usó inmediatamente para la reacción con la solución de anticuerpo.

#### 1.11.3 Síntesis de $\alpha$ -Amanitina-glutarato-Herceptin (15)

- 20 Se adicionaron 0.1 mL de la solución de 3.0 mg de N-hidroxisuccinimidato del ácido  $\alpha$ -amanitina-glutárico a 10 mg de anticuerpo de Herceptin en 5 mL de PBS y se hizo reaccionar bajo rotación lenta a 5°C en la oscuridad. Después de 16 h, la solución se aplicó a una columna Sephadex G25 (120 x 1.5 cm) equilibrada con PBS, y se recogió la fracción de proteína. La carga de la amanitina se determinó espectrofotométricamente a partir de la diferencia de absorción a 310 nm de la solución de proteína frente a un blanco que contenía la misma concentración del anticuerpo nativo, utilizando el coeficiente de extinción molar de las amatoxinas de  $13.500 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . La relación  $\alpha$ -amanitina: La IgG de esta preparación fue aproximadamente 4.



(15)

#### 1.12. Ejemplo comparativo: Síntesis de Amino faloidina (APHD)-suberoil-huHEA 125

La amino faloidina se preparó a partir de mono-tosilfaloidina por reacción con amoniaco metanólico. La conjugación de aminofaloidina con huHEA125 se realizó en analogía a la reacción descrita en 1.5.3.

#### 5 Ejemplo 2: Estudios de unión

##### 2.1 Análisis de competencia de unión

La unión del conjugado huHEA125-amanitina3 frente a anticuerpo huHEA125 no conjugado se analizó en un experimento de competición mediante citometría de flujo. El conjugado de  $\alpha$ -amanitina-huHEA125 se sintetizó como se ha descrito anteriormente en las secciones 1.6.1 a 1.6.3.

- 10 Las células diana Colo205 (metástasis de cáncer de colon) se lavaron dos veces en solución reguladora FACS (PBS de Dulbecco con suero de ternero fetal inactivado por calor al 1% y azida de sodio al 0.1%) se contaron y ajustaron a  $2 \times 10^7$  células por mL. Se administraron cincuenta  $\mu\text{L}$  de suspensión celular a cada pozo de una placa de microtitulación de fondo en U de 96 pozos a los que se pipetearon 50  $\mu\text{L}$ /pozo de anticuerpo huHEA125 marcado con FITC. Se
- 15 adicionaron por triplicado diluciones en serie de amanitina-huHEA125 o huHEA125 que varían desde 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 10 ng/mL de dilución final en un volumen de 50  $\mu\text{L}$ /pozo y se incubaron durante 1 hora sobre hielo. Posteriormente, la placa se centrifugó (2 min a 2000 rpm) y el sobrenadante se retiró de las células. Las células se resuspendieron en 150  $\mu\text{L}$  de solución reguladora FACS y se centrifugaron de nuevo. Después de dos etapas de lavado por centrifugación, las células se recogieron en 100  $\mu\text{L}$ /pozo de solución de yoduro de propidio (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en solución reguladora FACS) permitiendo la discriminación de células muertas. El análisis se realizó en un citómetro FACScan (Becton and Dickinson, Heidelberg, Alemania) utilizando el software CellQuest.
- 20

Como se muestra en la figura 2, la competencia de unión a células diana con cantidades crecientes de conjugado huHEA125-amanitina o anticuerpo huHEA125 no modificado reveló una fuerza de unión comparable en todo el intervalo de concentración desde 10 ng/mL a 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpo o conjugado de anticuerpo. Por lo tanto, el procedimiento de conjugación no alteró significativamente la afinidad de huHEA125-amanitina a las células diana.

- 25 2.2 Expresión superficial del antígeno EpCAM en diversas líneas celulares de carcinoma detectadas por inmunofluorescencia indirecta

Las líneas celulares Capan-1, Colo205, OZ y MCF-7 se incubaron primero con ya sea huHEA125 o Xolair®. Después del lavado, la unión del anticuerpo primario se visualizó mediante IgG (H+L) antihumana de cabra  $F(ab')_2$  marcada con FITC como reactivo de la segunda etapa. Los resultados se muestran en la figura 3A (Capan-1), la figura 3B (Colo205), la figura 3C (OZ), y la figura 3D (MCF-7). Los histogramas sombreados en gris en el lado izquierdo de cada diagrama muestran los resultados obtenidos con el anticuerpo control Xolair®; los histogramas que tienen un área blanca en el lado derecho de cada diagrama muestran los resultados obtenidos con el anticuerpo huHEA125.

30

#### 2.3 Unión de conjugados huHEA125-amanitina y huHEA125-faloidina a células de cáncer de mama MCF-7

La unión de los conjugados huHEA125-amanitina y huHEA125-faloidina frente al anticuerpo huHEA125 no conjugado se analizó por citometría de flujo. Las células diana MCF-7 se lavaron dos veces en solución reguladora FACS (PBS de Dulbecco con suero de ternero fetal inactivado por calor al 1% y azida de sodio al 0.1%) se contaron y se ajustaron a  $2 \times 10^7$  células por mL. Se administraron cincuenta  $\mu\text{L}$  de suspensión celular a cada pozo de una placa de microtitulación de fondo en U de 96 pozos. Las inmunotoxinas huHEA125-amanitina1, huHEA125-amanitina4 y huHEA125-faloidina así como, así como el anticuerpo huHEA125 no conjugado se adicionaron a una concentración de  $1 \mu\text{g/mL}$  en un volumen de  $100 \mu\text{L}$  por pozo y se incubaron durante 1 h sobre hielo. La placa se centrifugó (2 min a 2000 rpm) y el sobrenadante se retiró de las células. Las células se resuspendieron en  $150 \mu\text{L}$  de solución reguladora FACS y se centrifugaron de nuevo. Posteriormente, se adicionaron  $100 \mu\text{L}$  IgG (H+L) antihumana de cabra  $\text{F(ab')}_2$  marcada con FITC por pozo y se incubaron de nuevo durante 1 h en hielo. Después de dos etapas de lavado por centrifugación, las células se recogieron en  $100 \mu\text{L}$ /pozo de solución de yoduro de propidio ( $1 \mu\text{g/mL}$  en solución reguladora FACS) permitiendo la discriminación de células muertas. El análisis se realizó en un citómetro FACScan (Becton and Dickinson, Heidelberg, Alemania) utilizando el software CellQuest.

Como se muestra en la figura 4, la capacidad de unión de las inmunotoxinas a las células diana se redujo sólo moderadamente mediante el procedimiento de conjugación. Cuando se comparó con el anticuerpo huHEA125 no modificado mostrando una intensidad de fluorescencia media (MFI) de 1094, la conjugación con amanitina1 disminuyó la unión a MFI 730, la conjugación con amanitina4 dio como resultado una MFI de 905, mientras que el acoplamiento a alfa-faloidina redujo MFI a 604. Estos valores se obtuvieron con cantidades idénticas de anticuerpos de conjugados.

Ejemplo 3: Inhibición específica del crecimiento de células de carcinoma por inmunconjugados compuestos de anticuerpo huHEA125 y amanitina en diferentes sitios de unión

### 3.1 Ensayo de proliferación

La inhibición del crecimiento celular por conjugados de amanitina-IgG se determinó por incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina. Se prepararon por triplicado diluciones en serie de amanitina-huHEA125 y amanitina en medio completo (RPMI 1640 suplementado con FCS inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM y piruvato de sodio 1 mM) que varían desde  $2 \times 10^{-5}$  M a  $6 \times 10^{-13}$  M en un volumen de  $100 \mu\text{L}$  en los pozos de una placa de microtitulación de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pozos. En cada pozo se adicionaron células en  $50 \mu\text{L}$  a una densidad de  $5 \times 10^4$  por mL en los experimentos con huHEA125-Amanitina1 y huHEA125-Amanitina4 y a una densidad de  $2 \times 10^4$  por mL en los experimentos con huHEA125-Amanitina3. Las placas se incubaron en una atmósfera humidificada a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 72 o 96 h. A las 20 h antes del final del ensayo, se adicionó  $1 \mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-timidina. Posteriormente, las placas se procesaron con una cosechador de células Tomtec y la radiactividad incorporada se determinó por recuento de centelleo líquido (Wallac Betaplate Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer Life and Analytical Sciences) y se dieron como cpm.

3.2 Comparación de la inhibición de la proliferación de las células de carcinoma causada por conjugados utilizando diferentes sitios de unión en la unidad estructural de amanitina

En las figuras 5, 6 y 9 se representan tres ejemplos de inhibición del crecimiento inducida por diferentes conjugados de amanitina-IgG. En los tres experimentos se utilizaron células MCF-7. La figura 5 muestra una comparación de huHEA125-Amanitina1 con el Xolair-Amanitina1 control no unido y con, sin Amanitina. En el experimento representado en la figura 6, huHEA125-Amanitina4 se comparó con un conjugado alfa-faloidina huHEA125 y con Amanitina libre. La figura 9 muestra una comparación de huHEA125-Amanitina3 con anticuerpo de control provisto de Amanitina Xolair y con, sin Amanitina.

La  $\text{IC}_{50}$  de los conjugados huHEA125-amanitina1 y huHEA125-amanitina4 fueron aproximadamente  $5 \times 10^{-12}$  M (Figuras 5 y 6) y la  $\text{IC}_{50}$  del conjugado huHEA125-amanitina3 fue de aproximadamente  $2 \times 10^{-12}$  M (Figura 9). Por el contrario, la preparación de faloidina-huHEA125 no mostró prácticamente ningún efecto al menos en los niveles de dosis probados (Figura 6). De acuerdo con estos hallazgos anteriores, la  $\text{IC}_{50}$  de la Amanitina sola está en el intervalo de  $10^{-7}$  M (Figuras 5, 6 y 9).

3.3 Comparación de la inhibición de la proliferación de las células de carcinoma para diferentes líneas celulares

En las figuras 7, 8, 9 y 10 se representan cuatro ejemplos de inhibición del crecimiento probados en cuatro líneas celulares de carcinoma diferentes. En los cuatro experimentos se utilizó el conjugado huHEA125-Amanitina3.

En el caso de la línea celular de carcinoma pancreático Capan-1, la inmunotoxina huHEA125-Amanitina3 indujo la detención del crecimiento a concentraciones de amanitina de  $1 \times 10^{-11}$  a  $3 \times 10^{-10}$  M como se representa en la figura 7.

En el caso de la línea celular de cáncer de colon Colo205, la inmunotoxina huHEA125-Amanitina3 indujo la detención del crecimiento a concentraciones de amanitina de  $1 \times 10^{-12}$  a  $4 \times 10^{-11}$  M como se representa en la figura 8.

En el caso de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, la inmunotoxina huHEA125-Amanitina3 indujo la detención del crecimiento a concentraciones de amanitina de  $1 \times 10^{-12}$  a  $1 \times 10^{-11}$  M como se representa en la figura 9.

En el caso de la línea celular de colangiocarcinoma OZ, la inmunotoxina huHEA125-Amanitina3 indujo la detención del crecimiento a concentraciones de amanitina de  $1 \times 10^{-11}$  a  $6 \times 10^{-10}$  M como se representa en la figura 10.

- 5 Ejemplo 4: Inhibición específica del crecimiento de las células de carcinoma por inmunocombinados compuestos de anticuerpo de Herceptin y amanitina en diferentes sitios de unión y utilizando una química de unión diferente

La inhibición del crecimiento celular por combinados de amanitina-Herceptin se determinó por incorporación de BrdU *in vitro* como se describe en Current Protocols in Immunology 1 (véase el capítulo 7.10, Coligan, J. E. et al., eds.) John-Wiley & Sons, New York). Se incubaron los combinados (3), (4), (7), (10), (11), (14), Herceptin no combinado y la  $\alpha$ -amanitina como tales durante 72 h y 120 h, respectivamente, con tres líneas de células tumorales que expresan Her2/neu en alta concentración, a saber, SKOV-3, SK-BR-3 y NCI-N87 y una línea celular negativa a Her2/neu, MDA-MB231. El Herceptin no combinado no mostró citotoxicidad en ninguna línea celular mientras que los diversos combinados de amanitina mostraron una marcada toxicidad en las líneas celulares positivas a Her2/neu con una  $EC_{50}$  en el intervalo pico a nanomolar, no se observó toxicidad significativa en la línea celular negativa a Her2/neu. (Véanse las figuras 11A a 11D). La concentración molar indicada se indica en base a la amanitina entera comprendida en el combinado respectivo.

Ejemplo 5: Modelo de tumor de xenoinjerto *in vivo*

Un modelo de xenoinjerto de tumor de ratón, en donde  $2.5 \times 10^8$  de células de carcinoma ovárico SKOV-3 se implantan subcutáneamente (s.c.) en ratones SCID y se deja crecer durante 10 días. Después de 10 días, se administraron por vía intravenosa una dosis única de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal (véase la figura 12A) o de 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal (véase la figura 12B) de diversos combinados de  $\alpha$ -amanitina-Herceptin (Combinados (15), (3), (4), (10), (11) y (7)) y Herceptin no combinado (Control). Se observó una clara reducción dependiente de la concentración del crecimiento tumoral. Los combinados (7), (10) y (15) condujeron a una remisión total del tumor dentro del periodo de observación, esto es, 87 días desde el inicio del experimento.

## 25 Referencias

- Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(7), 3983-3988 (2003)
- Allard W.J., Matera J., Miller M.C., Repollet M., Connelly M.C., Rao C., Tibbe A.G., Uhr J.W., Terstappen L.W. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. Clin. Cancer Res. 10(20), 6897-6904 (2004)
- 30 Baeuerle P.A. and Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. Br. J. Cancer 96(3), 417-423 (2007)
- Balzar M., Winter M.J., de Boer C.J., Litvinov S.V. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). J. Mol. Med. 77(10), 699-712 (1999)
- Binz H.K., Amstutz P., Plückthun A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. Nat Biotechnol. 23(10):1257-1268 (2005)
- 35 Brody E.N. and Gold L., Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. J. Biotechnol. 74(1):5-13 (2000)
- Dalerba P., Dylla S.J., Park I.K., Liu R., Wang X., Cho R.W., Hoey T., Gurney A., Huang E.H., Simeone D.M., Shelton A.A., Parmiani G., Castelli C., Clarke M.F. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104(24), 10158-10163 (2007)
- 40 Gastl G., Spizzo G., Obrist P., Dünser M., Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. Lancet 356(9246), 1981-1982 (2000)
- Holliger P., Prospero T., Winter G. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(14), 6444-6448 (1993)
- Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Kölbl, H. eds. "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland), 1995
- 45 Li C., Heidt D.G., Dalerba P., Burant C.F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M.F., Simeone D.M. Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res. 67(3), 1030-1037(2007)

- Moldenhauer G., Momburg F., Möller P., Schwartz R., Hämmerling G.J. Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br. J. Cancer* 56(6), 714-721 (1987)
- Momburg F., Moldenhauer G., Hämmerling G.J., Möller P. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res.* 47(11), 2883-2891 (1987)
- 5 Nagrath S., Sequist L.V., Maheswaran S., Bell D.W., Irimia D., Ulkus L., Smith M.R., Kwak E.L., Digumarthy S., Muzikansky A., Ryan P., Balis U.J., Tompkins R.G., Haber D.A., Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 450(7173), 1235-1239 (2007)
- Spizzo G., Obrist P., Ensinger C., Theurl I., Dünser M., Ramoni A., Gunsilius E., Eibl G., Mikuz G., Gastl G. Prognostic significance of Ep-CAM AND Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. *Int. J. Cancer* 98(6), 883-888 (2002)
- 10 Spizzo G., Went P., Dirnhofer S., Obrist P., Simon R., Spichtin H., Maurer R., Metzger U., von Castelberg B., Bart R., Stopatschinskaya S., Köchli O.R., Haas P., Mross F., Zuber M., Dietrich H., Bischoff S., Mirlacher M., Sauter G., Gastl G. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 86(3), 207-213 (2004)
- 15 Trzpis M., McLaughlin P.M., de Leij L.M., Harmsen M.C. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am. J. Pathol.* 171(2), 386-395 (2007)
- Varga M., Obrist P., Schneeberger S., Mühlmann G., Felgel-Farnholz C., Fong D., Zitt M., Brunhuber T., Schäfer G., Gastl G., Spizzo G. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin. Cancer Res.* 10(9), 3131-3136 (2004)
- 20 Went P.T., Lugli A., Meier S., Bundi M., Mirlacher M., Sauter G., Dirnhofer S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum. Pathol.* 35(1), 122-128, 2004
- Wie land, T. and Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous Amanita mushrooms. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 5(3), 185-260 (1978)
- Winter M.J., Nagtegaal I.D., van Krieken J.H., Litvinov S.V. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am. J. Pathol.* 163(6), 2139-2148 (2003)
- 25 Listado de secuencias – información de texto libre
- SEQ ID NO: 1: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, forma unida a la membrana
- SEQ ID NO: 2: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, forma secretada
- SEQ ID NO: 3: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, dominio VH
- SEQ ID NO: 4: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento FR1
- 30 SEQ ID NO: 5: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento CDR1
- SEQ ID NO: 6: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento FR2
- SEQ ID NO: 7: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento CDR2
- SEQ ID NO: 8: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento FR3
- SEQ ID NO: 9: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento CDR3
- 35 SEQ ID NO: 10: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento FR4
- SEQ ID NO: 11: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera
- SEQ ID NO: 12: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, dominio VL
- SEQ ID NO: 13: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento FR1
- SEQ ID NO: 14: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento CDR1
- 40 SEQ ID NO: 15: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento FR2
- SEQ ID NO: 16: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento CDR2

## ES 2 621 104 T3

- SEQ ID NO: 17: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento FR3
- SEQ ID NO: 18: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento CDR3
- SEQ ID NO: 19: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento FR4
- SEQ ID NO: 20: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, dominio CDR1
- 5 SEQ ID NO: 21: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, dominio CDR2
- SEQ ID NO: 22: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, dominio CDR3
- SEQ ID NO: 23: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, dominio CDR1
- SEQ ID NO: 24: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, dominio CDR2
- SEQ ID NO: 25: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, dominio CDR3
- 10 SEQ ID NO: 26: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, dominio constante, forma unida a la membrana
- SEQ ID NO: 27: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, dominio constante, forma secretada
- SEQ ID NO: 28: anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, dominio constante
- Listado de secuencias
- <110> Faulstich, Heinz and Deutsches Krebsforschungszentrum
- 15 <120> Componentes de unión a la superficie de células terapéuticas provistas de amatoxina, diseñados para terapia de tumores
- <130> 616-5 PCT
- <140>
- <141> 2010-04-08
- 20 <150> US 61/167,690
- <151> 2009-04-08
- <150> US 61/222,227
- <151> 2009-07-01
- <160> 28
- 25 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 514
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 30 <220>
- <223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, forma unida a la membrana
- <400> 1



ES 2 621 104 T3

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Phe  
 20 25 30  
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Glu Ile Asn Leu Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Gly Ile Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 115 120 125  
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 130 135 140

ES 2 621 104 T3

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 165 170 175  
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 180 185 190  
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 195 200 205  
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 210 215 220  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 265 270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350  
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

ES 2 621 104 T3

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Leu Gln Leu Asp  
 435 440 445  
 Glu Thr Cys Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr  
 450 455 460  
 Thr Ile Thr Ile Phe Ile Ser Leu Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Val Thr Leu Phe Lys Val Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val  
 485 490 495  
 Glu Leu Lys Gln Thr Leu Val Pro Glu Tyr Lys Asn Met Ile Gly Gln  
 500 505 510  
 Ala Pro

<210> 2

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, forma secretada

<400> 2

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Phe  
 20 25 30  
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Glu Ile Asn Leu Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Gly Ile Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

ES 2 621 104 T3

```

                115                    120                    125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
  130                          135                          140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
  145                          150                          155                          160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                            165                          170                          175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
                            180                          185                          190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
  195                          200                          205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
  210                          215                          220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
  225                          230                          235                          240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
  245                          250                          255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
  260                          265                          270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
  275                          280                          285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
  290                          295                          300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
  305                          310                          315                          320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
  325                          330                          335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
  340                          345                          350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
  355                          360                          365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
  370                          375                          380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

```



ES 2 621 104 T3

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento FR1

<400> 4

gaagtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctca 75

<210> 5

5 <211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento CDR1

10 <400> 5

ggattcgatt ttagtagatt ctgg 24

<210> 6

<211> 51

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento FR2

<400> 6

atgacttggg tccggcagc tccagggaaa gggctagaat ggattggaga a 51

20 <210> 7

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento CDR2

<400> 7

attaatctag atagcagtac gata 24

<210> 8

<211> 114

30 <212> ADN

<213> Artificial

ES 2 621 104 T3

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento FR3

<400> 8

```
aactatacgc catctctaaa ggataaattc atcatctcca gggacaacgc caaaaatacg      60
ctgttcctgc aaatgagcaa agtgagatct gaggacacag ccctttatta ctgt      114
```

5 <210> 9

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento CDR3

<400> 9

```
tcaagaggtt ttctatgga ctac      24
```

<210> 10

<211> 33

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, segmento FR4

<400> 10

20 tggggtcagg gaacctcagt caccgtctcc tca 33

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera

<400> 11

ES 2 621 104 T3

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ile Ser  
 20 25 30  
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Ser Asp Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ile Trp Pro Thr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, dominio VL

<400> 12



ES 2 621 104 T3

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ile Ser  
 20 25 30  
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Ser Asp Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ile Trp Pro Thr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 13

<211> 78

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento FR1

<400> 13

**gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60**  
**ttctcctgca gggccagt 78**

10 <210> 14

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento CDR1

<400> 14

cagagcattg gcataagt 18

<210> 15

<211> 51

20 <212> ADN

<213> Artificial

ES 2 621 104 T3

<220>  
<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento FR2  
<400> 15  
ttactctggt atcagcaaag accaagtgat tctccaaggc ttctcataaa g 51  
5 <210> 16  
<211> 9  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
10 <223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento CDR2  
<400> 16  
tatgcttct 9  
<210> 17  
<211> 108  
15 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento FR3  
<400> 17  
gagtcaatct ctgggatccc ttccaggttt agtggcagtg gatcagggac agattttact 60  
20 cttagcatca acagtgtgga gtctgaagat attgcagatt attactgt 108  
<210> 18  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial  
25 <220>  
<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento CDR3  
<400> 18  
caacaaagta atatctggcc aaccacg 27  
<210> 19  
30 <211> 30  
<212> ADN  
<213> Artificial

ES 2 621 104 T3

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, segmento FR4

<400> 19

ttcgggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa 30

5 <210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> anticuerpo quimérico huHE,4125, cadena pesada, dominio CDR1

<400> 20

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Phe Trp  
1 5

<210> 21

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, dominio CDR2

<400> 21

Ile Asn Leu Asp Ser Ser Thr Ile  
1 5

20

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, dominio CDR3

<400> 22

Ser Arg Gly Ile Ser Met Asp Tyr  
1 5

<210> 23

30 <211> 6

<212> PRT

ES 2 621 104 T3

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, dominio CDR1

<400> 23

Gln Ser Ile Gly Ile Ser  
1 5

5

<210> 24

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, dominio CDR2

<400> 24

Tyr Ala Ser  
1

<210> 25

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, dominio CDR3

20

<400> 25

Gln Gln Ser Asn Ile Trp Pro Thr Thr  
1 5

<210> 26

<211> 399

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, dominio constante, forma unida a la membrana

<400> 26

ES 2 621 104 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

ES 2 621 104 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Leu Gln Leu Asp Glu Thr Cys  
 325 330 335  
 Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr  
 340 345 350  
 Ile Phe Ile Ser Leu Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Ala Val  
 355 360 365  
 Thr Leu Phe Lys Val Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Glu Leu Lys  
 370 375 380  
 Gln Thr Leu Val Pro Glu Tyr Lys Asn Met Ile Gly Gln Ala Pro  
 385 390 395

<210> 27

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena pesada, dominio constante, forma secretada

<400> 27

ES 2 621 104 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
                     20                    25                    30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
                     35                    40                    45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
                     50                    55                    60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
                     65                    70                    75                    80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
                     85                    90  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
                     100                    105                    110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
                     115                    120                    125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
                     130                    135                    140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
                     145                    150                    155                    160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
                     165                    170                    175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
                     180                    185  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
                     195                    200                    205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
                     210                    215                    220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
                     225                    230                    235                    240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                     245                    250                    255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                     260                    265                    270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

ES 2 621 104 T3

```

                275                280                285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290                295                300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305                310                315                320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                330

```

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo quimérico huHEA125, cadena ligera, dominio constante

<400> 28

```

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1                5                10                15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20                25                30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35                40                45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50                55                60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65                70                75                80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85                90                95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100                105

```

10

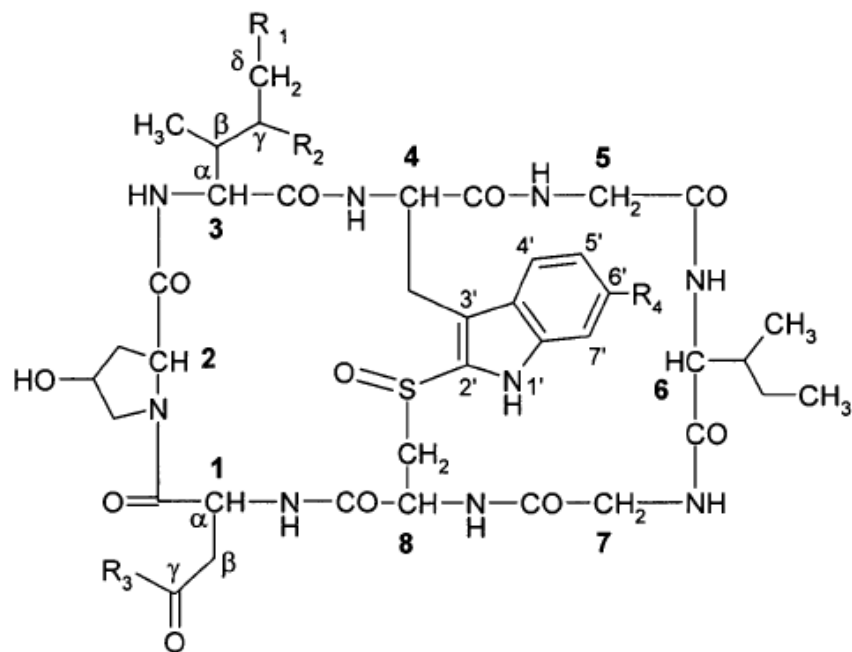


Reivindicaciones

1. Un conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana, que comprende:
- (i) una unidad estructural de unión a una diana;
  - (ii) al menos una amatoxina; y
- 5 (iii) opcionalmente un enlazante L3;
- en donde la al menos una amatoxina está conectada a la unidad estructural de unión a una diana o, si está presente, al enlazante L3 a través del átomo de C  $\delta$  del aminoácido 3 de la amatoxina;
- en donde la unidad estructural de unión a una diana se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de los mismos;
- 10 (ii) proteína de tipo anticuerpo, en donde dicha proteína de tipo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, anticalinas, proteínas de repetición de anquirina diseñadas y proteínas con andamios basados en ubiquitina; y
- (iii) aptámero de ácido nucleico.
- 15 2. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la reivindicación 1, en donde la amatoxina está conectada a la unidad estructural de unión a una diana o, si está presente, al enlazante L3 a través un átomo de oxígeno unido al átomo de C  $\delta$  del aminoácido 3 de la amatoxina.
3. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la reivindicación 1 o 2, en donde la amatoxina está conectada a la unidad estructural de unión a una diana o, si está presente, al enlazante L3 a través un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano.
- 20 4. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el enlazante L3 está presente y el conjugado tiene una de las siguientes estructuras:
- (i) amatoxina- $\delta$ C-O-C(O)-L3-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana;
  - (ii) amatoxina- $\delta$ C-O-L3-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana; o
  - (iii) amatoxina- $\delta$ C-O-C(O)-NH-L3-C(O)-NH-unidad estructural de unión a una diana.
- 25 5. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la unidad estructural de unión a una diana está conectada a la amatoxina o, si está presente, al enlazante L3 a través de un grupo amino presente en la unidad estructural de unión a una diana.
6. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la amatoxina se selecciona entre  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\delta$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, o ácido amanulínico, o de sales o análogos de los mismos,
- 30 en donde dicho análogo es un compuesto que es estructuralmente relacionado con uno cualquiera de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\delta$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, y ácido amanulínico, en donde dicho análogo es un análogo sintético de los mismos construido a partir de bloques de construcción de acuerdo con la estructura maestra del compuesto natural, en donde dicha estructura maestra es un péptido cíclico de 8 aminoácidos, y en donde dicho análogo presenta al menos 30% de la actividad inhibidora contra la ARN polimerasa II de mamífero en comparación con al menos uno de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\delta$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, y ácido amanulínico.
- 35 7. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la reivindicación 6, en donde la amatoxina es un análogo de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\delta$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, o ácido amanulínico que contiene un aminoácido no-hidroxilado en lugar de un aminoácido hidroxilado.
- 40 8. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de la reivindicación 6 o 7, en donde la amatoxina es un análogo de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\delta$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, o ácido amanulínico, en el que la unidad estructural tioeter sulfóxido se reemplaza por un sulfuro, sulfona, o por átomos diferentes del azufre.

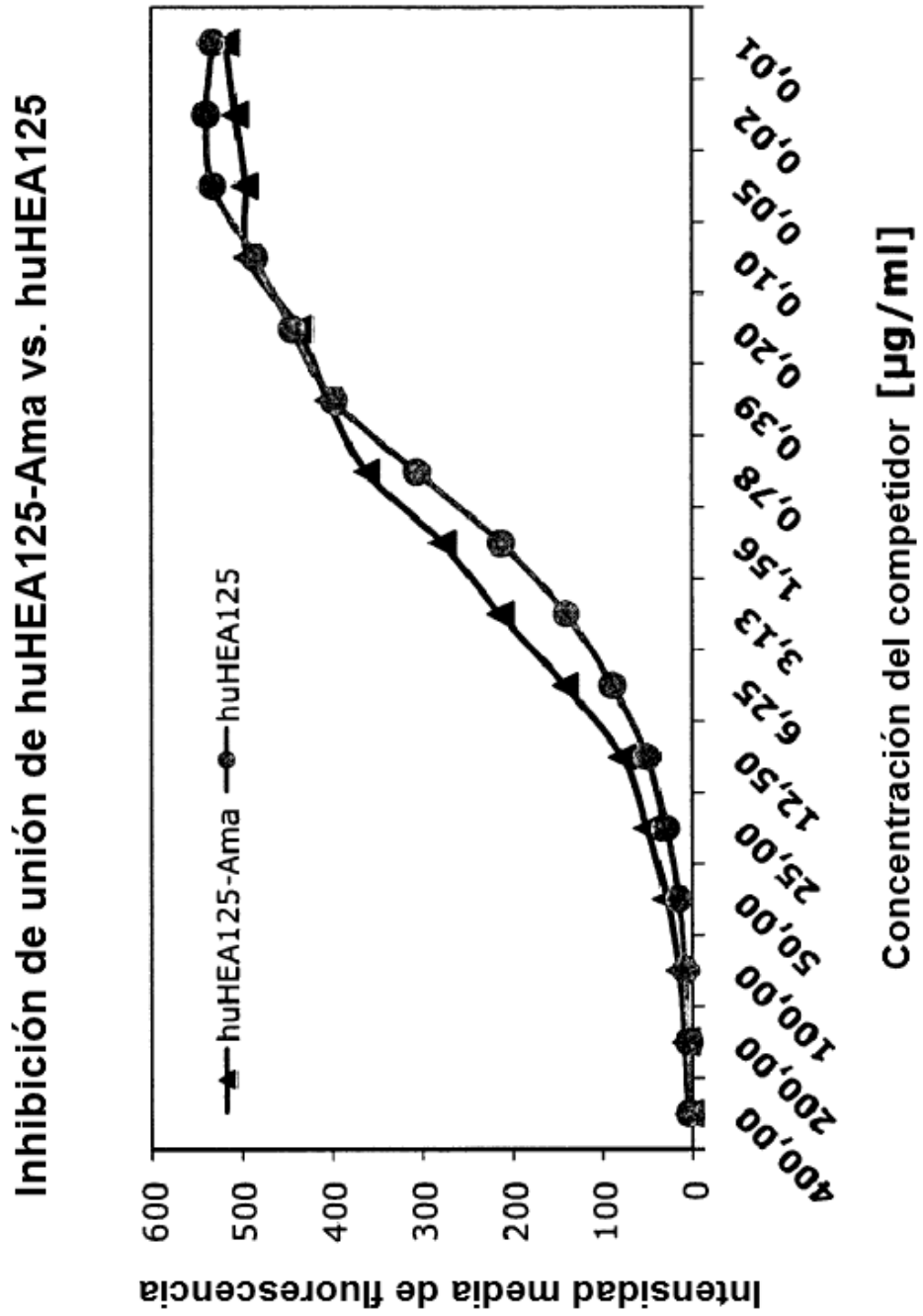
9. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el enlazante L3 es un grupo alquilo, heteroalquilo, alqueno, heteroalqueno, alquino, heteroalquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, o un heteroaralquilo.
- 5 10. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el enlazante L3 comprende un enlace disulfuro.
11. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde la unidad estructural de unión a una diana se une específicamente a un epítipo que está presente en una célula tumoral
- 10 12. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde el epítipo que está presente en una célula tumoral está comprendido en antígenos asociados con el cáncer definidos por células pertenecientes a productos génicos únicos de genes celulares mutados o recombinados, en particular quinasas dependientes de la ciclina, p15<sup>Ink4b</sup>, p53, AFP, B-catenina, caspasa 8, p53, producto de fusión Bcr-abl, MUM-1 MUM-2, MUM-3, ELF2M, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, RAGE, miosina/m, 707-AP, CDC27/m, ETV6/AML, TEL/Aml1, Dekcain, LDLR/FUT, Pm1-RARa, TEL/AML1; antígenos del cáncer de testículos (CT), miembros de la familia
- 15 MAGE, BAGE, DAM-6, DAM-10, miembros de la familia GAGE, NY-ESO-1, NA-88A, CAG-3, antígeno asociado a RCC G250, antígenos de virus tumoral, en particular oncoproteínas E6 E7 derivadas del virus del papiloma humano (HPV), virus Epstein Barr EBNA2-6, LMP-1, LMP-2; gp77, gp100, MART-1/Melan-A, p53, tirosinasa, proteína 1 y 2 relacionadas con la tirosina, PSA, PSM, MC1R; ART4, CAMEL, CEA, CypB, molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) HER2/neu, HER-3, hTERT, hTRT, ICE, Muc1, Muc2, PRAME RU1, RU2, SART-1, SART-2, SART-3, y WT1; y
- 20 fragmentos y derivados de los mismos.
13. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de los mismos se selecciona entre un diacuerpo, un tetracuerpo, un nanocuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo desinmunizado, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 25 14. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, Fv de cadena sencilla, y Fv con enlace disulfuro (dsFv).
15. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de los mismos comprende
- 30 (a) ya sea la forma unida a la membrana de la cadena pesada de huHEA125 (SEQ ID NO: 1) o la forma soluble de la cadena pesada de huHEA125 (SEQ ID NO: 2); y/o
- (b) la cadena ligera de huHEA125 (SEQ ID NO: 11).
16. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para uso en medicina.
- 35 17. El conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para el tratamiento del cáncer o una enfermedad autoinmune en un paciente, en donde el cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cáncer pancreático, colangiocarcinoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, tumores cerebrales, tumores en la infancia, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de piel epitelial, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno y la enfermedad autoinmune es preferiblemente senectud del grupo que consiste en y en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en espondilitis anquilosante, enfermedad de Chagas, enfermedad de Crohns, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS), enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso, enfermedad mixta del tejido conectivo, miastenia gravis, narcolepsia,
- 40 péñfigo vulgar, anemia perniciosa, psoriasis, artritis psoriásica, polimiositis, cirrosis biliar primaria, policondritis reincidente, artritis reumatoidea, esquizofrenia, síndrome de Sjögren, arteritis temporal, colitis ulcerativa y granulomatosis de vasculitis de Wegener, en particular artritis reumatoide.
- 45 18. Composición farmacéutica que comprende al menos un tipo del conjugado de toxina de unidad estructural de unión a una diana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y que comprende además uno o más diluyentes, portadores, excipientes, agentes de carga, aglutinantes, lubricantes, deslizantes, desintegrantes, adsorbentes; y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.
- 50

Fig. 1



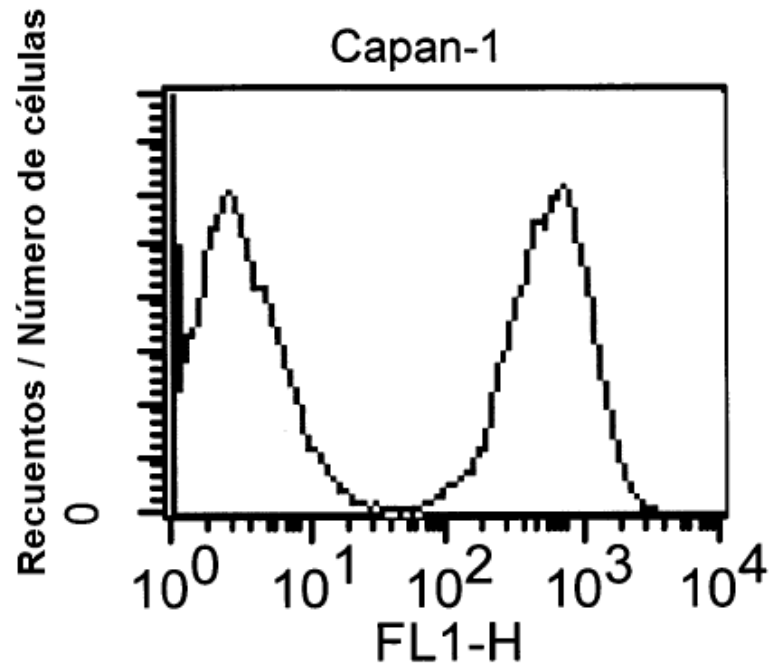
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
$\alpha$ -amanitina	OH	OH	NH <sub>2</sub>	OH
$\beta$ -amanitina	OH	OH	OH	OH
$\gamma$ -amanitina	H	OH	NH <sub>2</sub>	OH
$\varepsilon$ -amanitina	H	OH	OH	OH
amanina	OH	OH	OH	H
amaninamida	OH	OH	NH <sub>2</sub>	H
amanulina	H	H	NH <sub>2</sub>	OH
ácido amanulínico	H	H	OH	OH

Fig. 2



**Fig. 3**

**A**



**B**

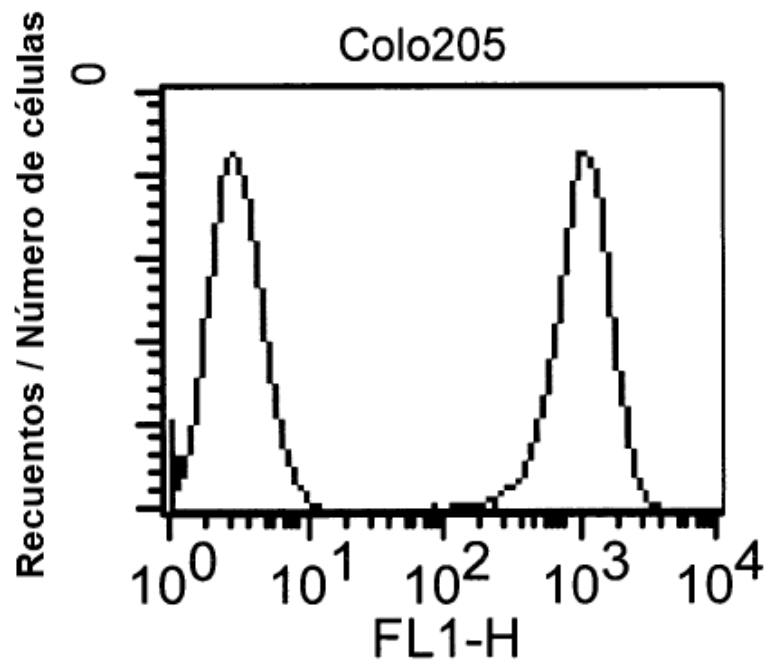
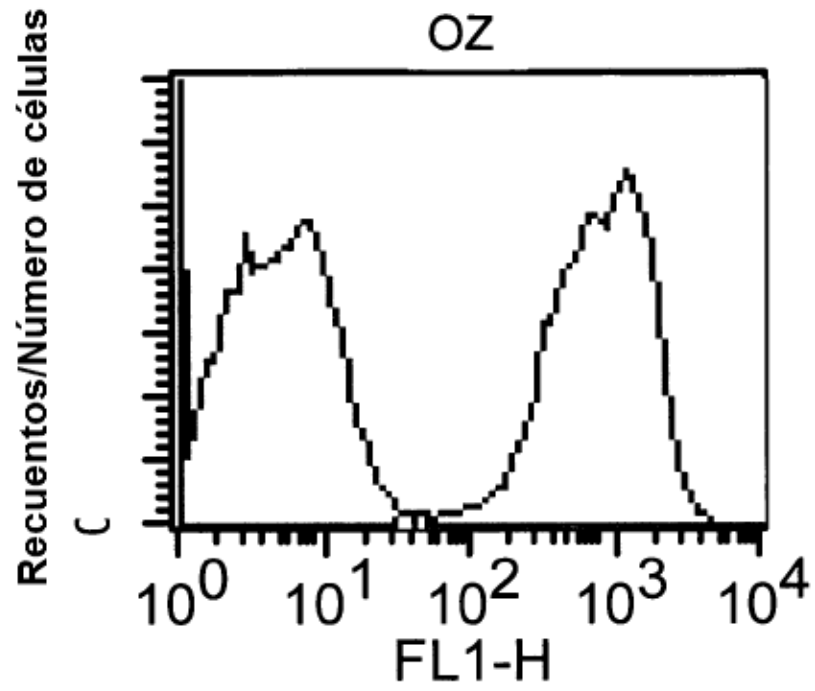


Fig. 3

C



D

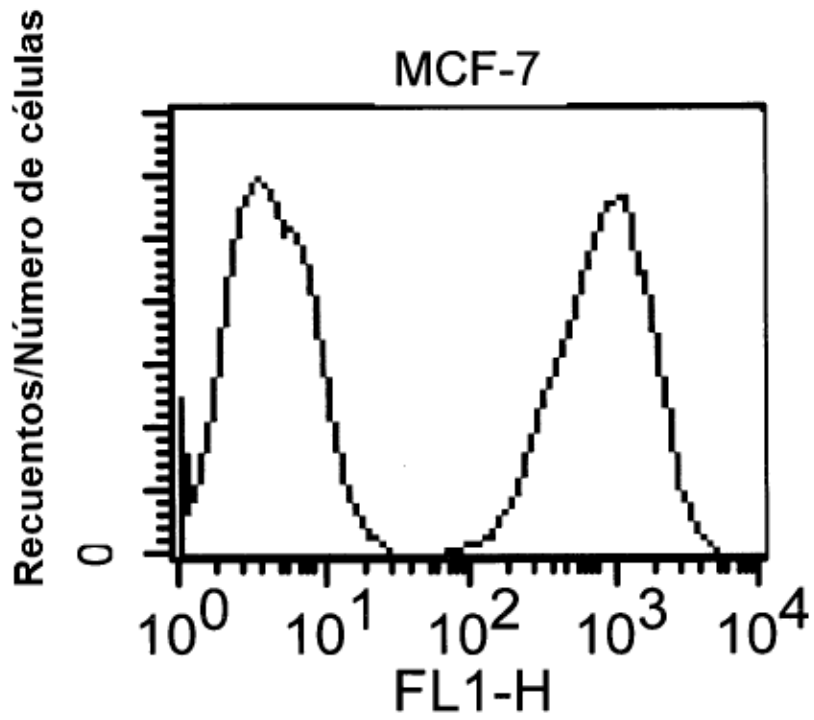


Fig. 4

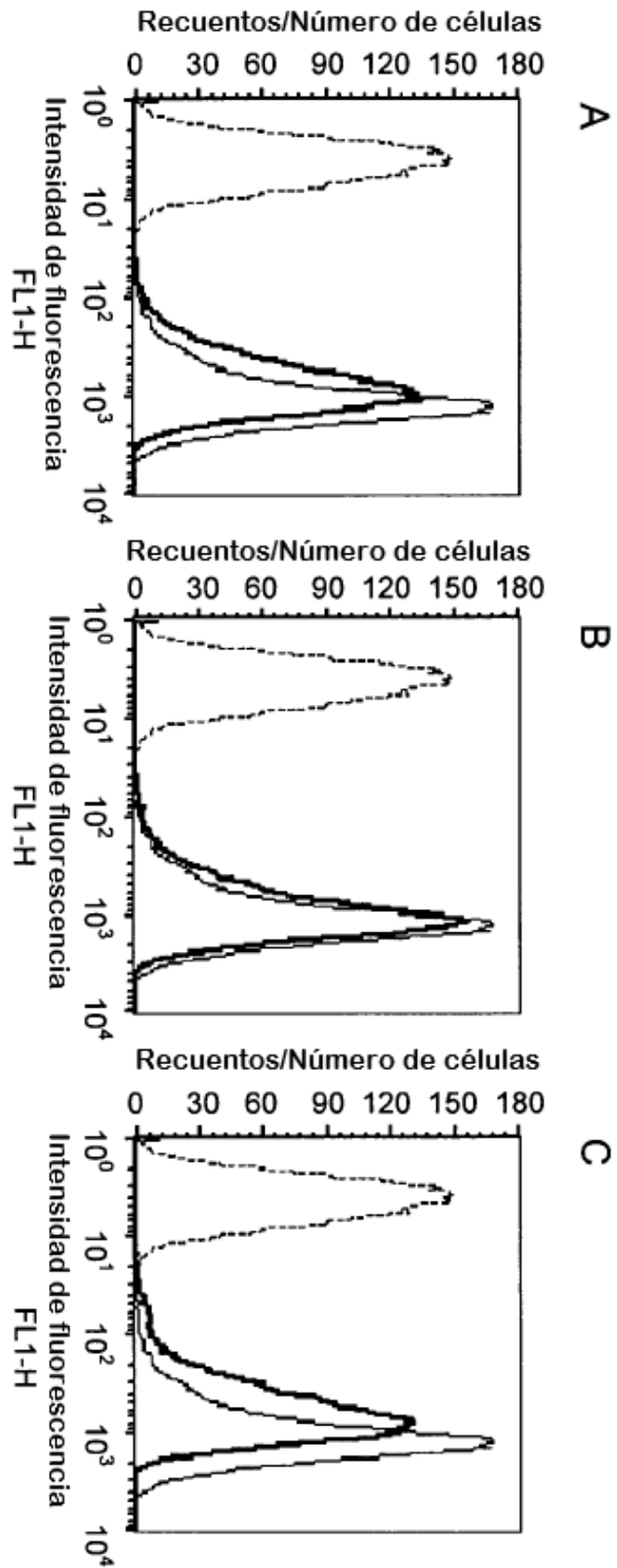


Fig. 5

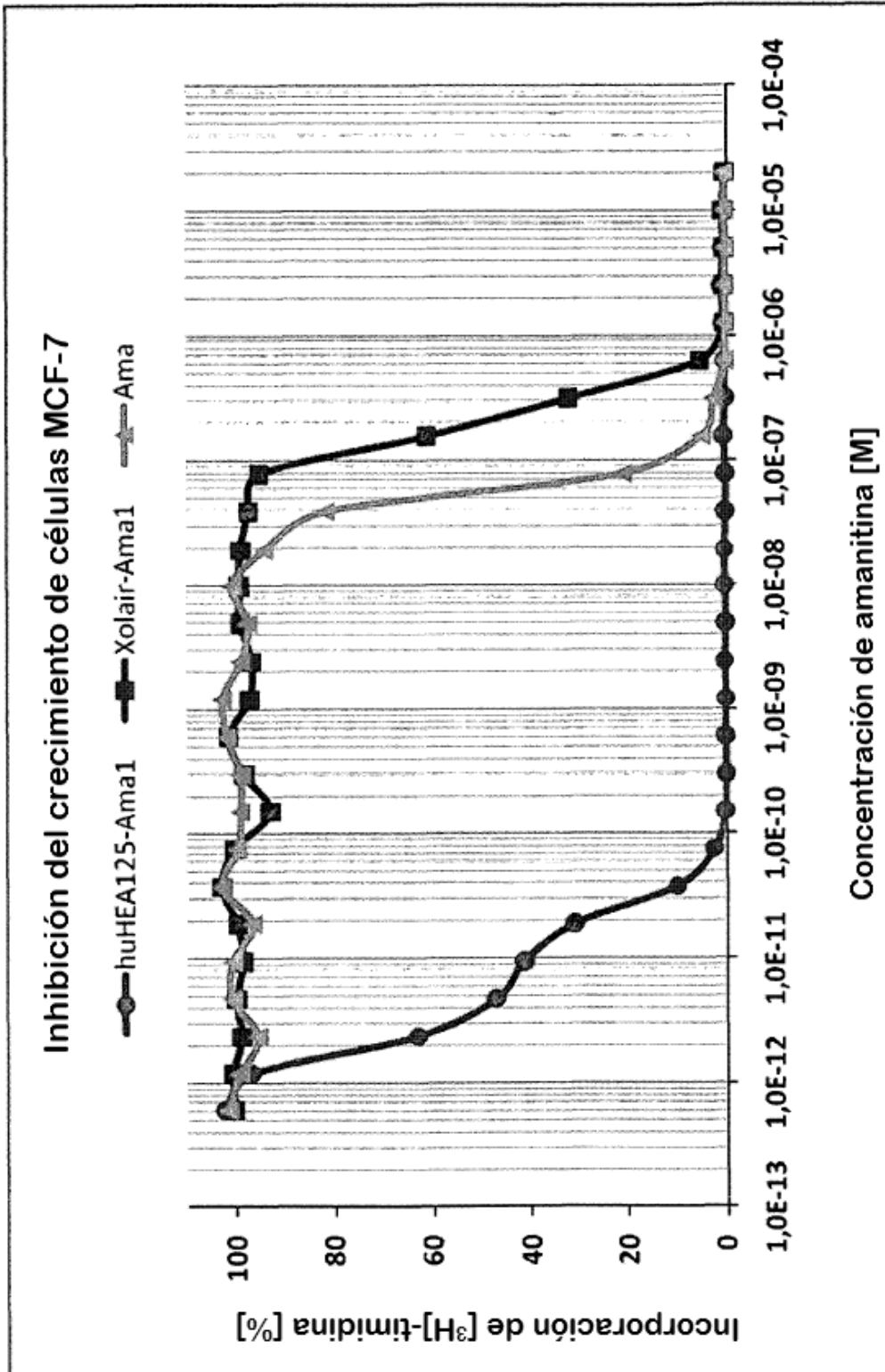




Fig. 6

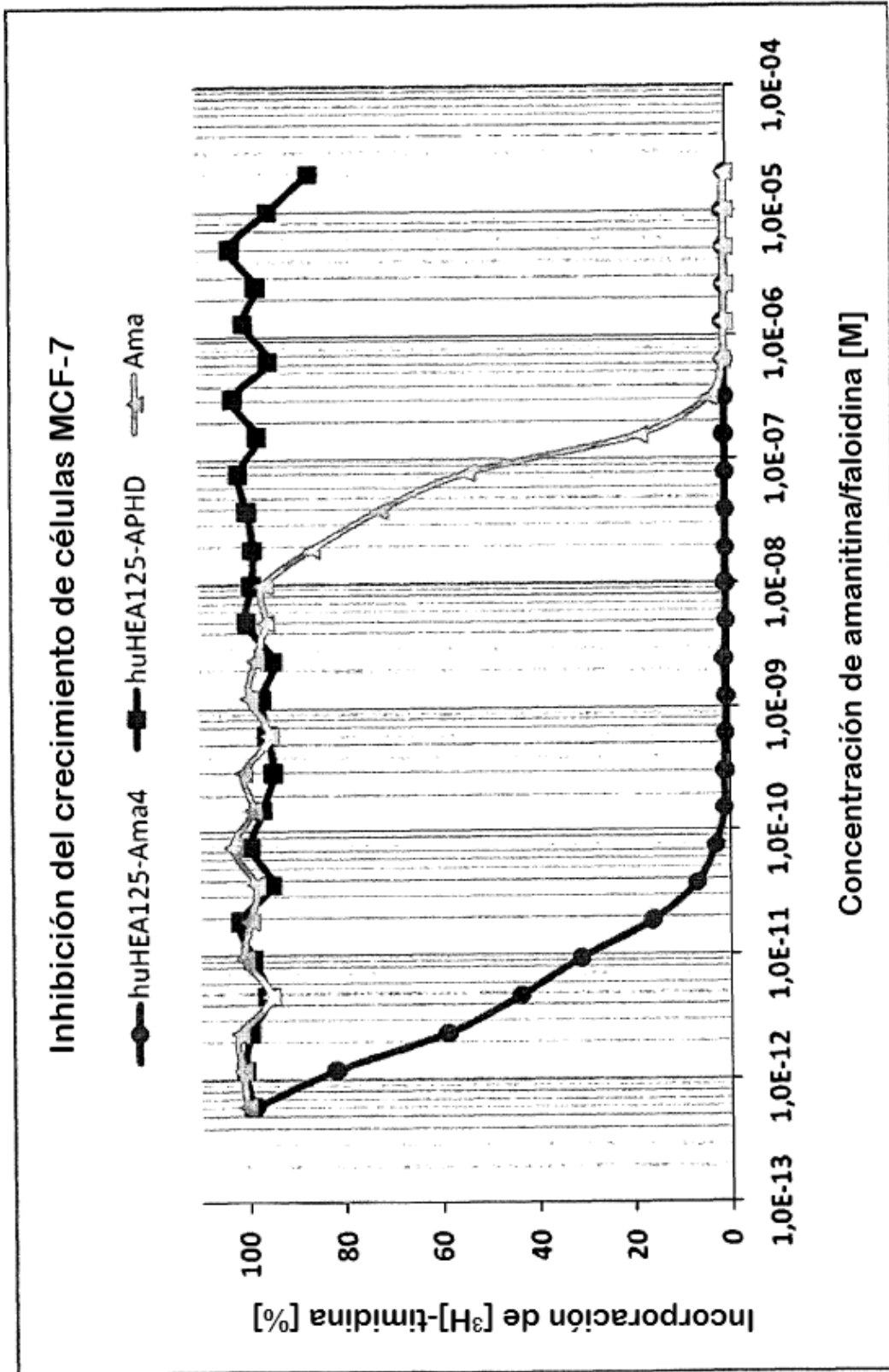


Fig. 7

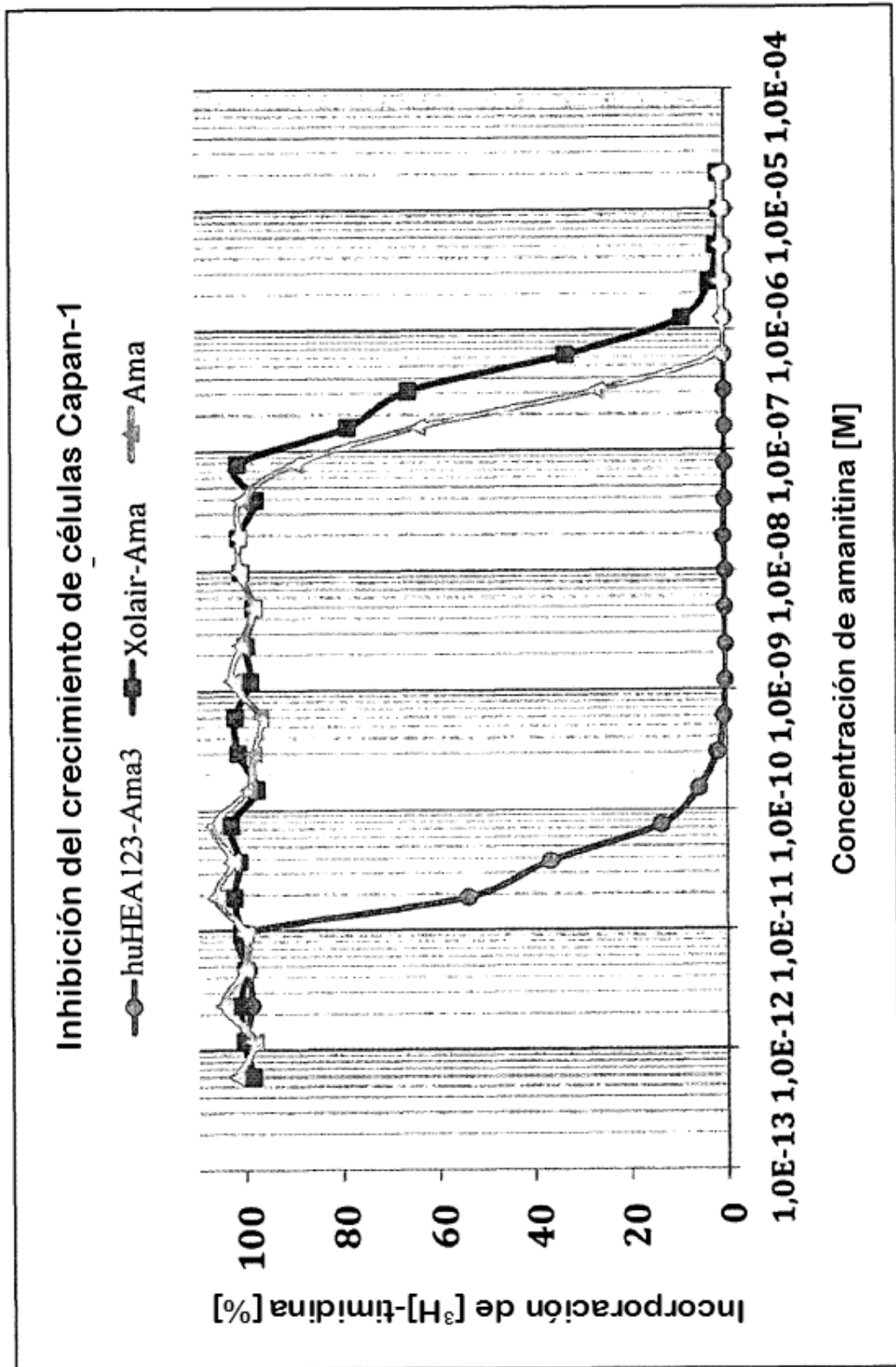


Fig. 8

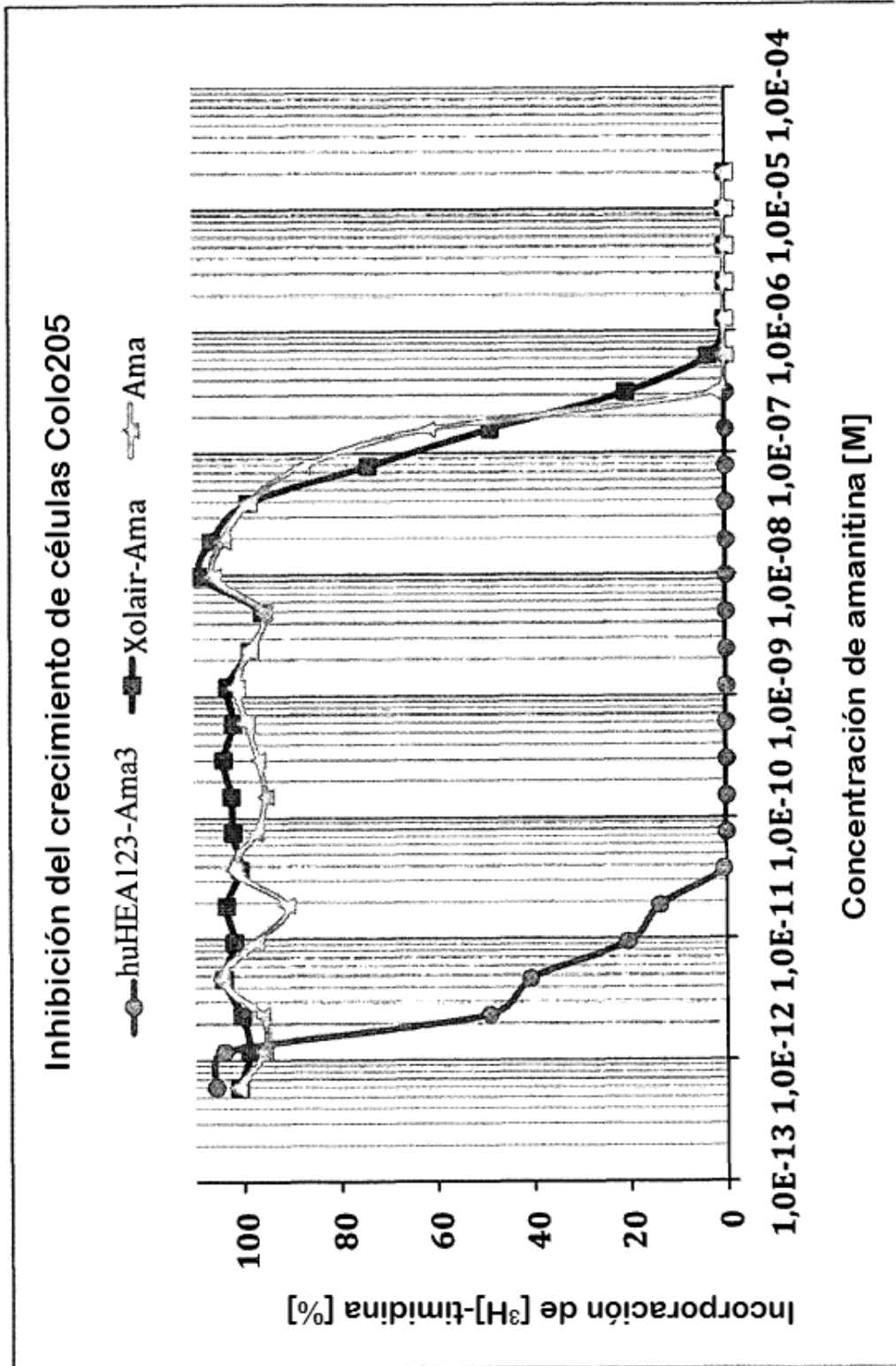


Fig. 9

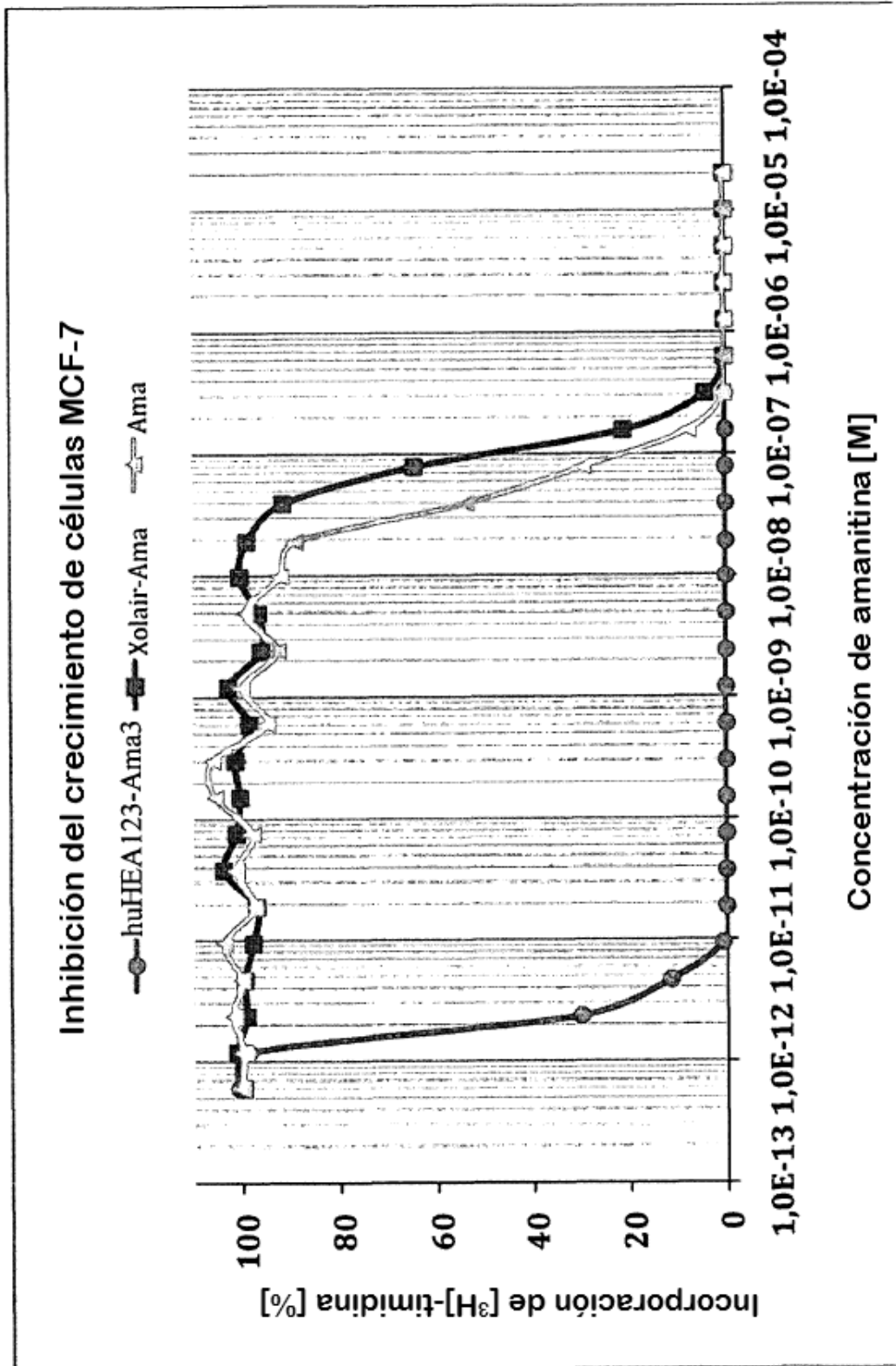


Fig. 10

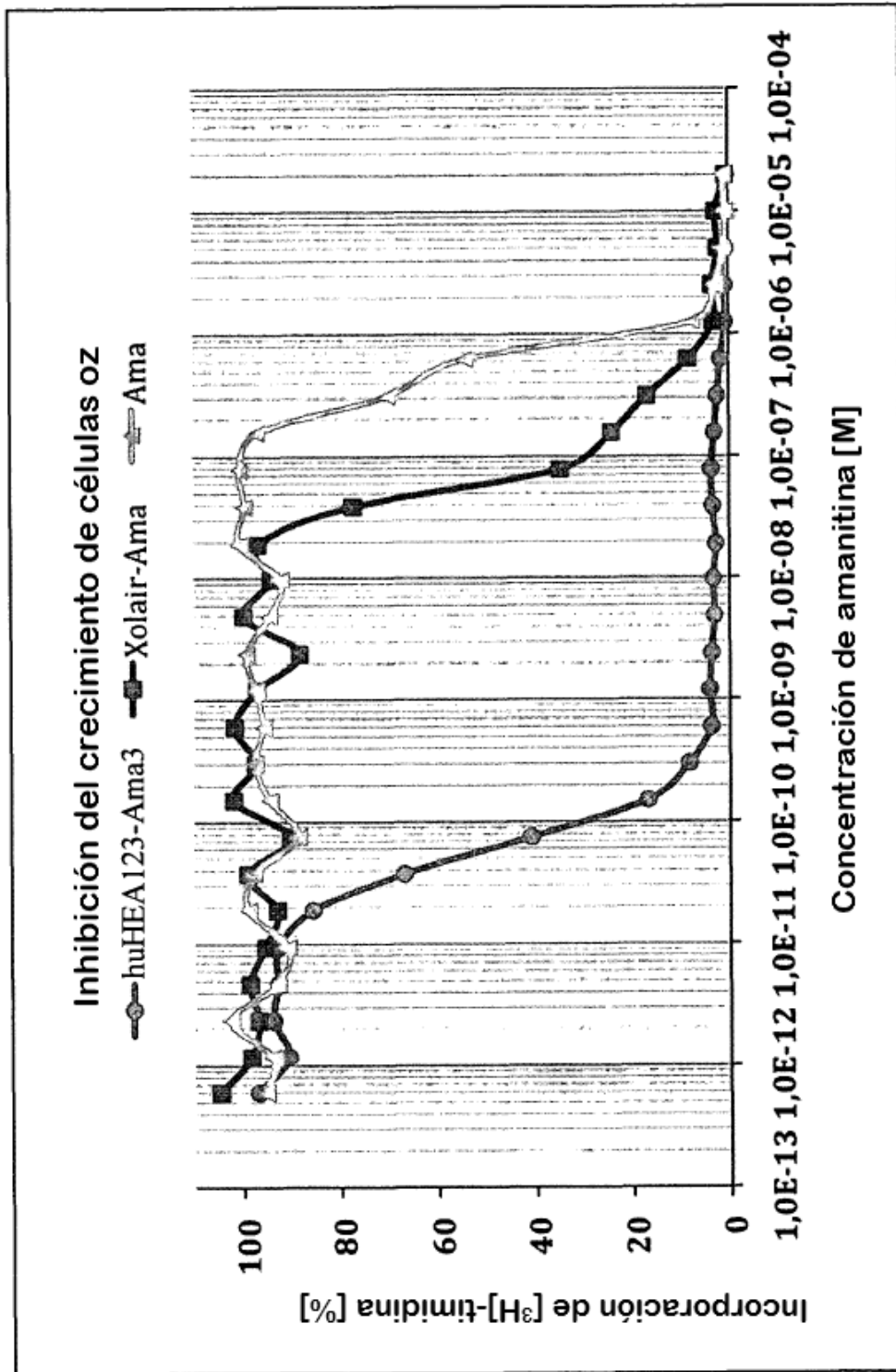
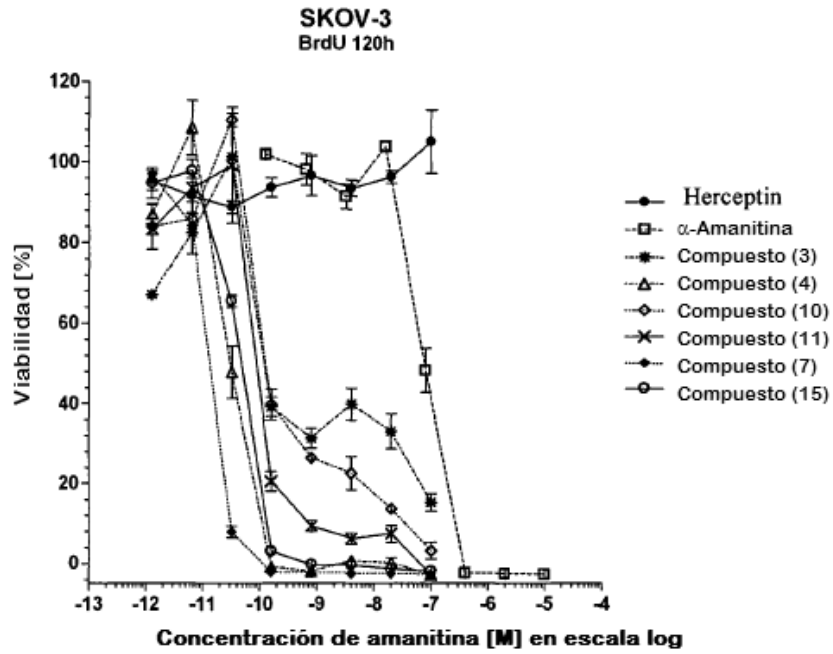
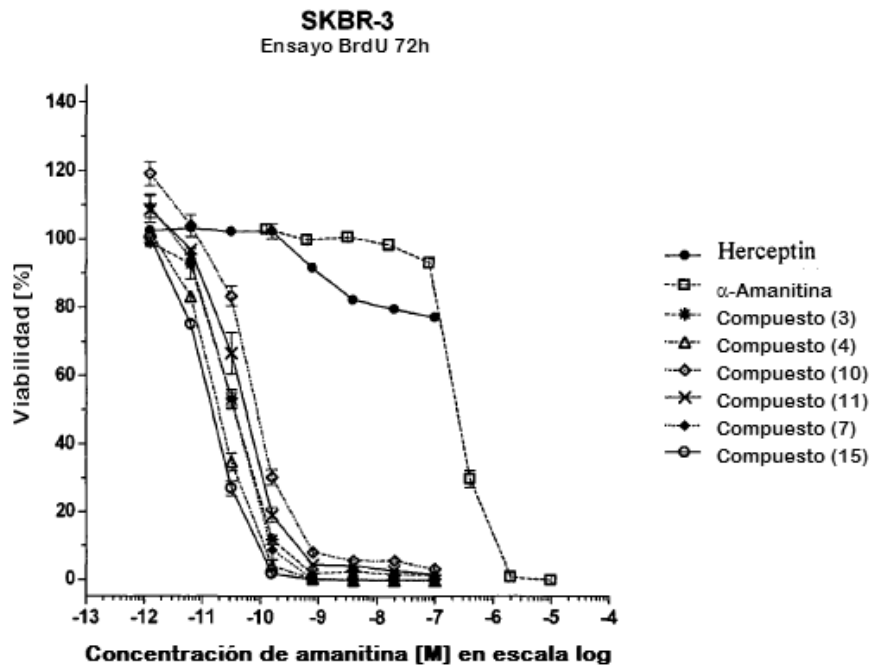


Fig. 11

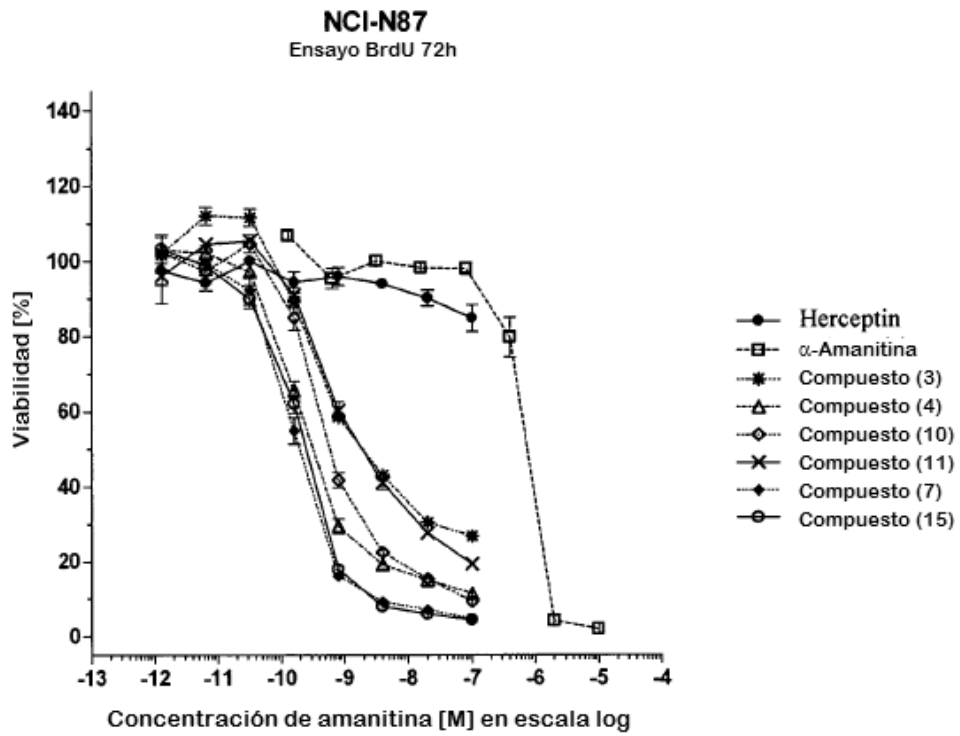
A



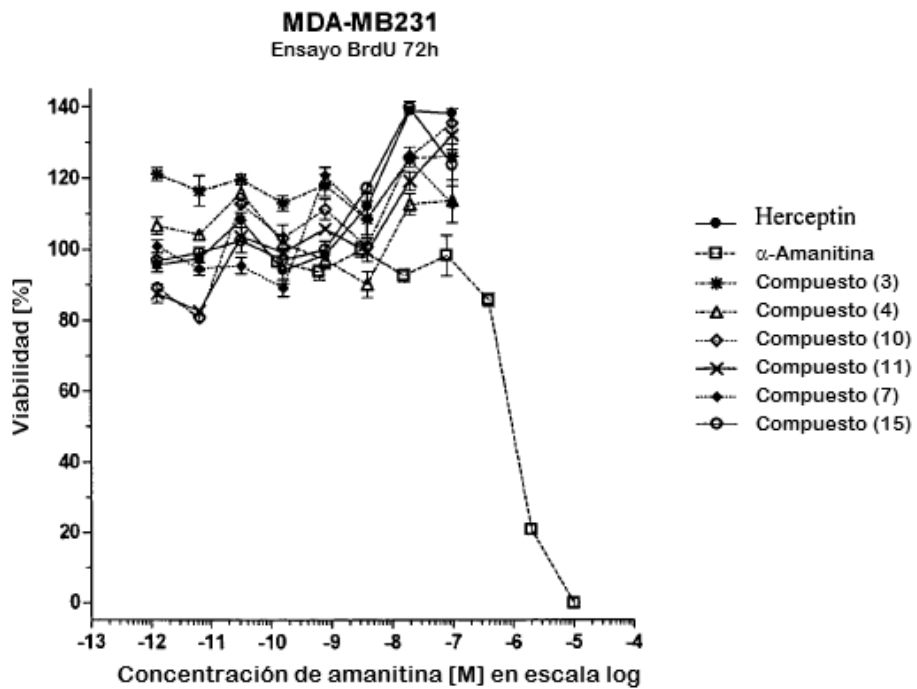
B



C



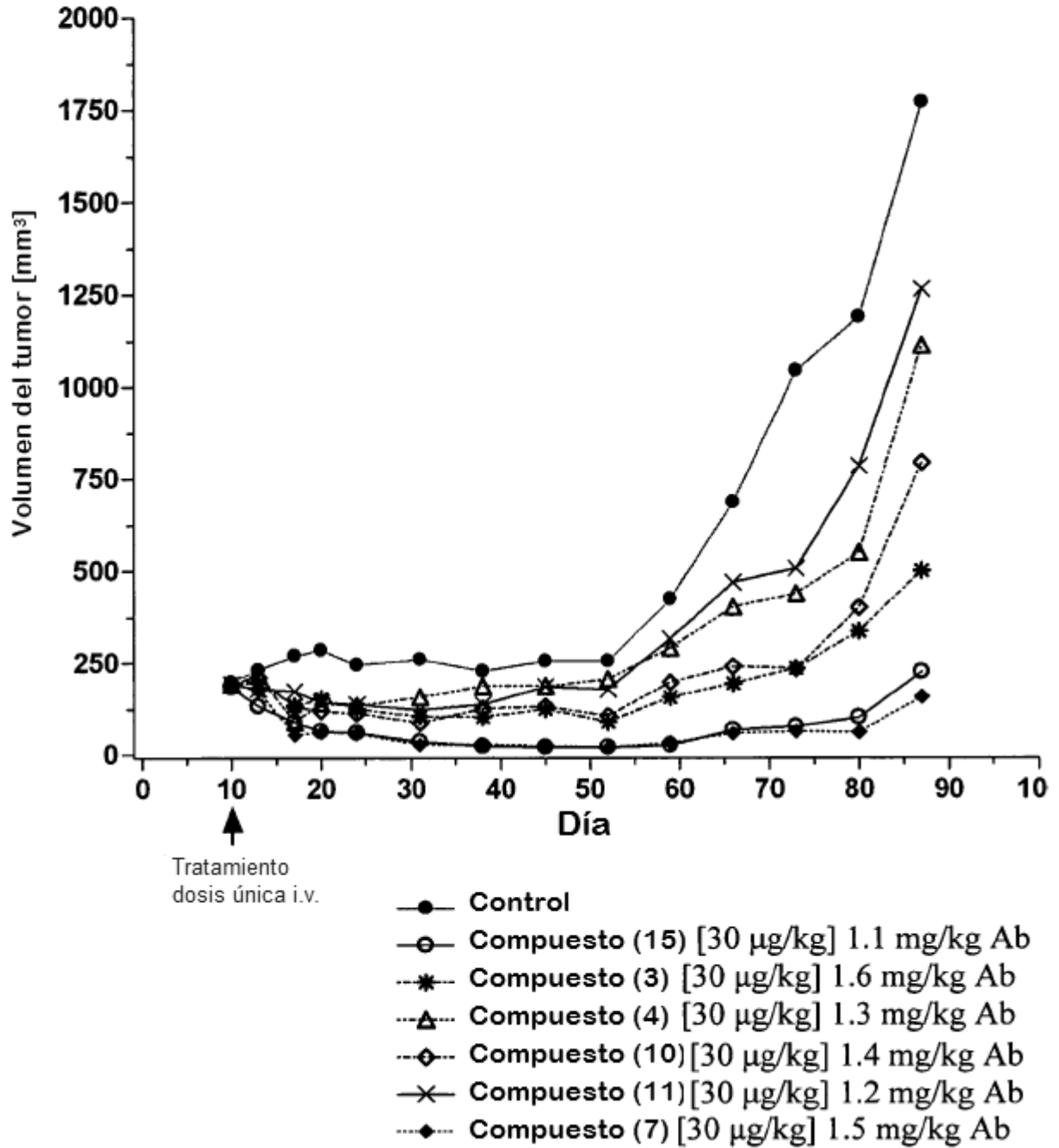
D



**Fig. 12**

**A**

**Xenoinjerto s.c. SKOV-3  
1X i.v. día 0**





B

