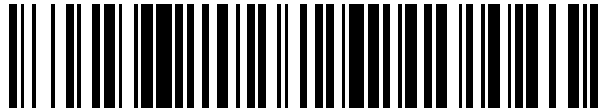


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 013**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68	(2007.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 31/18	(2006.01)
A61P 37/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2009 PCT/US2009/066371**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010 WO10093395**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09840166 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2396036**

54 Título: **Inmunoconjugados con una unión escindible intracelularmente**

30 Prioridad:

13.02.2009 US 207890 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2017

73 Titular/es:

**IMMUNOMEDICS, INC. (100.0%)
300 American Road
Morris Plains, NJ 07950**

72 Inventor/es:

**GOVINDAN, SERENGULAM, V.;
MOON, SUNG-JU y
GOLDENBERG, DAVID, M.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 640 013 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

Inmunocnjugados con una unión escindible intracelularmente

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo y SN-38, conjugado que se utiliza en el tratamiento de una enfermedad, y a una composición farmacéutica que comprende el conjugado.

Antecedentes de la invención

10 Durante varios años, un objetivo de los científicos dedicados al campo de la terapia farmacológica dirigida específicamente ha sido utilizar anticuerpos monoclonales (MAB, *monoclonal antibodies*) para el suministro específico de agentes tóxicos para los cánceres en seres humanos. Se han desarrollado conjugados de MAB asociados con tumores y agentes tóxicos adecuados, aunque estos han tenido un éxito mixto en la terapia contra el cáncer y virtualmente ninguna otra aplicación en otras enfermedades, tales como las enfermedades infecciosas y las autoinmunitarias. Lo más habitual es que el agente tóxico sea un fármaco quimioterapéutico, aunque también se han conjugado radionúclidos emisores de partículas o toxinas bacterianas o vegetales, especialmente con los MAB, para la terapia contra el cáncer (Sharkey y Goldenberg, CA Cancer J Clin. 2006 Jul-Aug;56(4):226-243) y, más recientemente, con radioinmunocnjugados para la terapia preclínica de ciertas enfermedades infecciosas (Dadachova y Casadevall, Q J Nucl Med Mol Imaging 2006;50(3):193-204).

20 Las ventajas de usar conjugados de MAB-fármacos quimioterapéuticos son las siguientes: (a) el fármaco quimioterapéutico en sí está estructuralmente bien definido; (b) el fármaco quimioterapéutico está unido a la proteína del MAB que emplea químicas de conjugación muy bien definidas, a menudo en sitios específicos remotos de las regiones de unión de antígenos de los MAB; (c) los conjugados de MAB-fármacos quimioterapéuticos pueden prepararse de un modo más reproducible que los conjugados químicos que requieren MAB y toxinas bacterianas o vegetales, y en tal sentido, se prestan más al desarrollo comercial y a la aprobación regulatoria y (d) los conjugados de MAB-fármacos quimioterapéuticos son varios órdenes de magnitud menos tóxicos sistémicamente que los conjugados de radionúclidos-MAB.

25 Los primeros trabajos sobre los conjugados de proteínas-fármacos indicaron que un fármaco se libera preferiblemente en su forma original, una vez que se ha internalizado en una célula objetivo o diana, para que el conjugado de proteína-fármaco quimioterapéutico sea un terapéutico útil. Trouet et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:626-629 (1982)) mostraron la ventaja de usar enlazadores peptídicos específicos entre el fármaco y la parte direccionadora, que se escinden lisosómicamente para liberar el fármaco intacto. Es de destacar que se desarrollaron conjugados de MAB-fármacos quimioterapéuticos preparados usando enlazadores suaves escindibles del ácido, tales como aquellos que contienen una hidrazona, basándose en la observación que el pH dentro de los tumores a menudo era menor que el pH fisiológico normal (Willner et al., documento de patente de los EE. UU. número 5.708.146; Trail et al. (Science 261:212-215 (1993)). El primer conjugado aprobado de MAB-fármaco, Gemtuzumab Ozogamicina, incorpora una unión de hidrazona lábil del ácido similar entre un anticuerpo anti-CD33 humanizado, P67.6, y un potente derivado de calicheamicina. Sievers et al., J Clin Oncol. 19:3244-3254 (2001); Hamann et al., Bioconjugate Chem. 13: 47-58 (2002). En ciertos casos, los conjugados de MAB-fármacos quimioterapéuticos se prepararon con enlaces de disulfuros impedidos reductoramente lábiles entre los fármacos quimioterapéuticos y el MAB (Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA 93: 8618-8623 (1996)).

40 Otro enlazador escindible implica los espaciadores dipeptídicos B-lábiles, tales como Phe-Lys o Val-Cit, similares a los espaciadores peptídicos lisosomalmente lábiles de Trouet *et al.*, que contienen entre uno y cuatro aminoácidos, que adicionalmente incorporaban un espaciador plegadizo entre el fármaco y el dipéptido (Dubowchik, et al., Bioconjugate Chem. 13:855-869 (2002); Firestone et al., documento de patente de los EE. UU. número 6.214.345 B1; Doronina et al., Nat Biotechnol. 21: 778-784 (2003)). Los últimos abordajes también se utilizaron en la preparación de un inmunocnjugado de camptotecina (Walker et al., Bioorg Med Chem Lett. 12:217-219 (2002)). Otra parte escindible que se ha explorado es un enlace éster incorporado en el enlazador entre el anticuerpo y el fármaco quimioterapéutico. Gillimard y Saragovi descubrieron que cuando se conjugaba un éster de paclitaxel con un MAB anti-rata p75, el MC192, o un MAB TrkA anti-humano, el 5C3, el conjugado denotaba toxicidad específica para la diana. Gillimard y Saragovi, Cancer Res. 61:694-699 (2001).

50 Los conjugados de la presente invención presentan una eficacia mayor, en muchos casos, que los anticuerpos no conjugados o "desnudos" o que los fragmentos de anticuerpos, pese a que dichas moléculas direccionadoras no conjugadas han sido de utilidad en situaciones específicas. En el cáncer, por ejemplo, los anticuerpos desnudos han comenzado a desempeñar una función en el tratamiento de los linfomas (CAMPATH® y RITUXAN®), del cáncer colorrectal y de otros tipos de cáncer (ERBITUX® y AVASTIN®), del cáncer de mama (HERECEPTIN®), así como también, una gran cantidad ahora en el desarrollo clínico (por ejemplo, epratuzumab). En la mayoría de los casos, el uso clínico ha implicado combinar estos anticuerpos desnudos o no conjugados con otras terapias, tales como quimioterapia o radioterapia.

También son útiles varios anticuerpos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y desreguladoras inmunitarias, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*) y anticuerpos de las células B

(RITUXAN®) en la artritis y se están investigando en otras enfermedades de esta naturaleza, tales como anticuerpos de células B, RITUXAN® y epratuzumab, en el lupus eritematoso sistémico y en el síndrome de Sjögren, así como también, en la diabetes juvenil y en la esclerosis múltiple. Los anticuerpos desnudos también se están estudiando para la septicemia y el shock séptico, la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades infecciosas. El desarrollo de anticuerpos monoclonales antiinfecciosos ha sido revisado recientemente por Reichert y Dewitz (Nat Rev Drug Discovery 2006; 5:191-195), que resume los principales patógenos contra los cuales se ha dirigido la terapia de anticuerpos desnudos; esto solo arrojó 2 patógenos contra los cuales los anticuerpos se encuentran en ensayos clínicos de fase III o ya se están comercializando (el virus sincitial respiratorio y el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina), otros 25 que están en estudios clínicos y 20 que fueron interrumpidos durante el estudio clínico.

Existe la necesidad de desarrollar anticuerpos anticancerígenos o antipatogénicos más potentes y otras partes de unión. Tales agentes terapéuticos mediados por anticuerpos pueden desarrollarse para el tratamiento de muchos patógenos diferentes, lo cual incluye bacterias, hongos, virus y parásitos, ya sea desnudos (no conjugados), radiomarcados o conjugados con fármacos/toxinas. Además también hace falta desarrollar conjugados de anticuerpos más efectivos con enlazadores escindibles intracelularmente, para emplearlos en el tratamiento contra el cáncer, para combatir patógenos y otras enfermedades. En caso del suministro de conjugados de fármaco/toxina o radionúclido, esto se puede lograr por conjugación directa de anticuerpos o mediante métodos indirectos, denominados predireccionamiento, en el que se emplea un anticuerpo biespecífico dirigido a la lesión, mientras que el agente terapéutico es dirigido de manera secundaria por unión a uno de los brazos del anticuerpo biespecífico que se ha localizado en el sitio del patógeno, del cáncer o de cualquiera fuera la lesión que se está tratando (Goldenberg et al., J Clin Oncol. 2006 Feb 10;24(5):823-34.; Goldenberg et al., J Nucl Med. 2008 Jan;49(1):158-63).

La solicitud del documento de patente de los EE. UU. número 2008/166363 A1 publicada se refiere a conjugados terapéuticos que comprenden una parte direccionadora, tales como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un enlazador y una camptotecina como parte terapéutica.

La solicitud de patente internacional con el número WO 2008/088658 A2 se refiere a un método y a composiciones para el suministro de agentes terapéuticos dirigidos a células, tejidos y organismos, por lo cual los agentes terapéuticos se unen a polímeros.

Sung-Ju M et al. (Sung-Ju M. et al., J. Med. Chem. 2008, 51, 6916-6926) dan cuenta de anticuerpos conjugados de 7etil-10-hidroxicomptotecina (SN-38) para la terapia dirigida al cáncer.

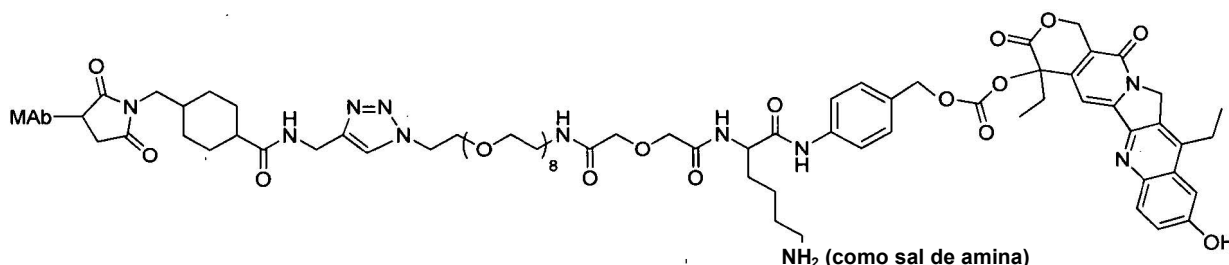
La solicitud de patente internacional WO que lleva el número 2004/054622 A1 se refiere a conjugados terapéuticos que comprenden una parte direccionadora —tal como un anticuerpo— y una parte terapéutica, por los que la parte direccionadora y la parte terapéutica están enlazadas mediante un enlace escindible de ácido.

La solicitud de patente internacional WO 2007/018431 A2 se refiere a compuestos que comprenden una o más partes terapéuticas y/o de diagnóstico y una o más partes funcionales unidas entre sí mediante uno o más enlazadores que contienen triazol.

35 Sumario de la invención

El problema subyacente de la presente invención se soluciona mediante el tema central de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas pueden ser tomadas de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Más particularmente, el problema subyacente de la presente invención se soluciona en un primer aspecto, mediante un conjugado que tiene una fórmula estructural de MAb-CL2A-SN-38, con una estructura representada por:



En una realización del primer aspecto, el MAb se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo primatizado, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fab', un fragmento de anticuerpo F(ab)₂, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂ y un fragmento de anticuerpo scFv.

En una realización del primer aspecto, el MAb es un anticuerpo monoclonal quimérico, primatizado, humanizado o humano, y dicho anticuerpo tiene dominios constantes y un dominio bisagra de una IgG1 humana o un anticuerpo de

IgG4 humana.

En una realización del primer aspecto, el MAb tiene dominios constantes y un dominio bisagra de un anticuerpo de IgG4 humana, donde la serina 228 de la bisagra se reemplaza por prolina.

5 En una realización del primer aspecto, el anticuerpo tienen dominios constantes, y la bisagra de un anticuerpo de IgG1 humana y donde uno o más aminoácidos de Fc están mutados para incrementar la semivida del anticuerpo en la sangre o donde una o más partes de azúcar del Fc se han eliminado, o donde se añaden una o más partes de azúcar para incrementar la semivida en sangre del anticuerpo.

En una realización del primer aspecto, dicho MAb se selecciona del grupo que consiste en hLL1, hLL2, RFB4, hA19, hA20, hRS7, hPAM4, hMN-3, hMN-14, hMu-9, hR1, CC49, hL243, D2/B y hImmu-31.

10 En una realización del primer aspecto, tal MAb se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en anhidrasa carbónica IX, B7, CCCL19, CCCL21, CSAP, HER-2/*neu*, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM5, CEACAM-6, alfa-fetoproteína (AFP), VEGF, ED-B fibronectina, EGP-1, EGP-2, receptor de EGF (ErbB1), ErbB2, ErbB3, Factor H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, Ga 733, GROB, HMGB1, factor inducible de la hipoxia (HIF, *hypoxia inducible factor*), HM1.24, HER-2/*neu*, factor de crecimiento del tipo insulina (ILGF, *insulin-like growth factor*), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-2R, IL4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, IGF-1R, Ia, HM1.24, gangliósidos, HCG, HLA-DR, CD66a-d, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, *macrophage migration-inhibitory factor*), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, factor de crecimiento de la placenta (PIGF, *placental growth factor*), PSA (*prostate-specific antigen*, antígeno prostático específico), PSMA (*Prostate-Specific Membrane Antigen*, antígeno de membrana específico de la próstata), dímero de PSMA, antígeno de PAM4, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM, KS-1, Le(y), mesotelina, S100, tenascina, TAC, antígeno de Tn, antígenos de Thomas-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, antígenos de angiogénesis tumoral, TNF- α , receptor de TRAIL (R1 y R2), VEGFR, RANTES, T101, antígenos de células madre cancerígenas, factores de complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5 y un producto oncogénico.

15

20

25

En una realización del primer aspecto, dicho MAb es multiespecífico, con múltiples brazos de unión para dirigirse por lo menos a dos antígenos o epitopos diferentes contenidos en la célula o en el patógeno diana, y uno o más brazos direccionadores están conjugados a CPT.

30 En una realización del primer aspecto, dicho MAb multiespecífico es un constructo de anticuerpos biespecíficos y/o bivalentes, que comprende uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en hLL1, hLL2, RFB4, hA19, hA20, hRS7, hPAM4, hMN-3, hMN-14, hMu-9, hR1, CC49, hL243, D2/B y hImmu-31.

En una realización del primer aspecto, dicho anticuerpo multiespecífico se une a dos o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en lo siguiente: anhidrasa carbónica IX, B7, CCCL19, CCCL21, CSAP, HER-2/*neu*, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM5, CEACAM-6, alfa-fetoproteína (AFP), VEGF, ED-B fibronectina, EGP-1, EGP-2, receptor de EGF (ErbB1), ErbB2, ErbB3, Factor H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, Ga 733, GROB, HMGB-1, factor inducible de la hipoxia (HIF), HM1.24, HER-2/*neu*, factor de crecimiento del tipo insulina (ILGF), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-2R, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL25, IP-10, IGF-1R, Ia, HM1.24, gangliósidos, HCG, HLA-DR, CD66a-d, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, *macrophage migration-inhibitory factor*), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, factor de crecimiento de la placenta (PIGF, *placental growth factor*), PSA (antígeno prostático específico), PSMA, dímero de PSMA, antígeno de PAM4, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM, KS-1, Le(y), mesotelina, S100, tenascina, TAC, antígeno de Tn, antígenos de Thomas-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, antígenos de angiogénesis tumoral, TNF- α , receptor de TRAIL (R1 y R2), VEGFR, RANTES, T101, antígenos de células madre cancerígenas, factores de complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, y un producto oncogénico.

35

40

45

Más particularmente, el problema subyacente de la presente invención se soluciona en un segundo aspecto, mediante un conjugado de acuerdo con el primer aspecto y cualquier realización del mismo, para usar en el tratamiento del cáncer.

50

Más particularmente, el problema subyacente de la presente invención se soluciona en un tercer aspecto a través de una composición farmacéutica, que comprende un conjugado según el primer aspecto y cualquier realización del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 La presente descripción resuelve una necesidad insatisfecha en la técnica, puesto que provee métodos y composiciones mejorados para la preparación de conjugados de partes que se unen al fármaco. Los métodos y las composiciones que se describen son para usar en el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones refractarias o menos respondedoras a otras formas terapéuticas y pueden incluir enfermedades contra las cuales pueden

desarrollarse partes direccionadoras (de unión) adecuadas, con el fin de lograr un direccionamiento selectivo, o bien están disponibles o bien, ya se conocen. Preferiblemente, la parte direccionadora es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico u otro anticuerpo multivalente u otra molécula u otro compuesto basado en un anticuerpo. El anticuerpo puede ser de varios isotipos, preferiblemente, IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4 o IgA, y puede ser un anticuerpo quimérico de humano-ratón, un anticuerpo quimérico de humano-primate, un anticuerpo humanizado (regiones marco humanas e hipervariables murinas (CDR) o anticuerpo totalmente humano, así como también variaciones de los mismos, tales como anticuerpos semi-IgG4 (denominados "unicuerpos"), tal como lo describen van der Neut Kofschoten et al. (Science 2007; 317:1554-1557), lo cual se ha incorporado. Sin embargo, pueden usarse otras partes de unión conocidas en la técnica, tales como aptámeros, avímeros o péptidos direccionadores. Las enfermedades o afecciones preferidas contra las cuales existen tales partes direccionadoras son, por ejemplo, el cáncer, las afecciones desreguladoras inmunitarias —las cuales incluyen las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias— y aquellas enfermedades causadas por organismos infecciosos.

Los métodos y las composiciones descritos pueden aplicarse de esta manera para el tratamiento de enfermedades y afecciones para las cuales las partes direccionadoras son de utilidad con el fin de suministrar agentes citotóxicos. Estas enfermedades o afecciones se pueden caracterizar por la presencia de una molécula diana o célula diana que no se ve afectada lo suficiente cuando se usan grupos no conjugados o desnudos, tales como en la inmunoterapia del cáncer o de una infección con organismos patógenos. (Para los métodos destinados a preparar inmunocombinados de anticuerpos con isótopos, fármacos y toxinas para usar en las terapias contra las enfermedades, véanse, por ejemplo, los documentos de patente de los EE. UU. con los números: 4.699.784; 4.824.659; 5.525.338; 5.677.427; 5.697.902; 5.716.595; 6.071.490; 6.187.284; 6.306.393; 6.548.275; 6.653.104; 6.962.702; 7.033.572; 7.147.856; 7.259.240 y las solicitudes de patente publicadas de los EE. UU. con los números 20050175582 (ahora abandonada); 20050136001; 20040166115 (ahora abandonada); 20040043030 (ahora abandonada); 20030068322 (ahora abandonada) y 20030026764 (ahora abandonada).

Se describe que la camptotecina (CPT) y sus análogos y derivados son partes quimioterapéuticas preferidas, aunque la invención no se limita de esta manera. Otras partes quimioterapéuticas que están contempladas en la invención son los taxanos (por ejemplo, baccatin III, taxol), epotilonas, antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina (DOX), epirubicina, morfolinodoxorubicina (morfolino-DOX), cianomorfolino-doxorubicina (cianomorfolino-DOX), y 2-pirrolinodoxorubicina (2-PDOX); véase Priebe W (ed.), ACS symposium series 574, published by American Chemical Society, Washington D.C., 1995 (332pp) y Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2464-2469, 1996), ansamicinas benzoquinoides ejemplificadas por geldanamicina (DeBoer et al., Journal of Antibiotics 23:442-447, 1970; Neckers et al., Invest. New Drugs 17:361-373, 1999) y similares. Preferiblemente, en los inmunocombinados de las realizaciones preferidas de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo se une al menos a una parte quimioterapéutica; preferiblemente se une a entre 1 y alrededor de 5 partes quimioterapéuticas; lo más preferiblemente se une a entre aproximadamente 7 y alrededor de 12 partes quimioterapéuticas.

Con relación al grupo de CPT de fármacos, son relevantes las cuestiones de insolubilidad en tampones acuosos y la labilidad de la parte de δ -lactona del anillo E de sus estructuras en condiciones fisiológicas. Un abordaje ha consistido en acilar el grupo 20-hidroxilo con un aminoácido, y acoplar el grupo α -amino de L-aminoácido al ácido poli-L-glutámico (Singer et al. in The Camptothecins: Unfolding Their Anticancer Potential, Liehr J.G., Giovannella, B.C. y Verschraegen (eds), NY Acad Sci., NY 922 :136-150 (2000)). Este abordaje se basa en la difusión pasiva de una molécula polimérica en los sitios de tumor. Esta conjugación de ciclinas también se ha reportado como un método para preparar un derivado hidrosoluble de CPT (Vishnuvajjala et al., documento de patente de los EE. UU. con el número 4.943.579) y en la preparación de una CPT derivada de PEG (Greenwald, et al. J. Med. Chem. 39: 1938-1940 (1996)). En el último caso, el abordaje ha sido concebido en el contexto de desarrollar formas hidrosolubles y de larga acción de la CPT, por lo que mejora la semivida de la CPT *in vivo*, y el fármaco se libera gradualmente desde su conjugado mientras está en circulación *in vivo*. Un ejemplo de un derivado de CPT hidrosoluble es CPT-11. Hay datos clínicos exhaustivos disponibles con relación a la farmacología de CPT-11 y su conversión *in vivo* al SN-38 activo (Iyer y Ratain, Cancer Chemother Pharmacol. 42:S31-43 (1998); Mathijssen et al., Clin Cancer Res. 7:2182-2194 (2002); Rivory, Ann NY Acad Sci. 922:205-215, 2000)). La forma activa SN-38 es de aproximadamente 2 a 3 órdenes de magnitud más potentes que CPT-11.

En ciertas realizaciones ejemplares, los conjugados farmacológicos de la invención, tal y como se define en las reivindicaciones, pueden usarse para dirigir el fármaco terapéutico a los patógenos, tales como bacterias, virus, hongos y parásitos. En las realizaciones preferidas, dichos conjugados farmacológicos pueden usarse en combinación con otras modalidades terapéuticas, tales como fármacos antifúngicos, antibióticos y antivirales y/o anticuerpos desnudos, inmunomoduladores (por ejemplo, interferones, interleucinas y/o citocinas). El uso de radioinmunoterapia para el tratamiento de organismos infecciosos se describe, por ejemplo, en los documentos de patente de los EE. UU. con los números: 4.925.648; 5.332.567; 5.439.665; 5.601.825; 5.609.846; 5.612.016; 6.120.768; 6.319.500; 6.458.933; 6.548.275 y en las publicaciones de solicitud de patente de los EE. UU. con los números 20020136690 y 20030103982.

En ciertas realizaciones que implican el tratamiento del cáncer, los conjugados farmacológicos de la invención, tal y como se definen en las reivindicaciones, pueden usarse en combinación con cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia con anticuerpos desnudos, radioinmunoterapia, inmunomoduladores, vacunas y similares. Se

5 prefieren las combinaciones similares en el tratamiento de otras enfermedades susceptibles a las partes
 direccionadoras, tales como las enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, los conjugados de la invención, tal y
 como se definen en las reivindicaciones se pueden combinar con inhibidores de TNF, anticuerpos de células B,
 interferones, interleucinas y otros agentes eficaces para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales
 como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, vasculitis, así como
 también diabetes del tipo I (diabetes juvenil). Estas terapias combinadas pueden permitir el uso de dosis menores de
 cada agente terapéutico que se administra en estas combinaciones, reduciendo de este modo ciertos efectos
 10 colaterales graves, y potencialmente, reduciendo los cursos terapéuticos requeridos. En las enfermedades virales,
 los inmunconjugados farmacológicos pueden combinarse con otros con fármacos terapéuticos,
 inmunomoduladores, MAb desnudos o vacunas (por ejemplo, MAb contra la hepatitis, el HIV o los virus del papiloma
 o vacunas basadas en inmunógenos de estos virus). Las vacunas basadas en anticuerpos y antígenos contra estos
 y otros patógenos virales son conocidas en la técnica y, en ciertos casos, ya son de uso comercial.

15 La invención también se refiere a un procedimiento para preparar conjugados, en el que el fármaco se obtiene en
 primer lugar con un primer enlazador; este primer enlazador contiene una parte reactiva, que es capaz de
 combinarse con un segundo enlazador, que contiene, además, un grupo de acoplamiento a la parte direccionadora;
 en el que el primer enlazador también posee una parte de polietilenglicol (PEG) para la solubilidad en agua y,
 opcionalmente, una parte escindible intracelularmente, escindible por peptidasas intracelulares o escindible por el
 medio de bajo pH de las vesículas endosomales y lisosomales y, opcionalmente, un separador de aminoácidos entre
 el fármaco y el primer enlazador; donde el segundo enlazador contiene una parte reactiva capaz de reaccionar con
 20 el conjugado de fármaco-(primer enlazador) por la reacción de cicloadición de acetileno catalizado por el ion cobre
 (+1)-azida, que se denomina 'química clic'. Preferiblemente, el parte PEG definida es un PEG de bajo peso
 molecular, con un número definido de subunidades monoméricas, como se explica más adelante.

25 La descripción también se refiere a un procedimiento para preparar conjugados, tal como se explica en el párrafo
 anterior, donde el segundo enlazador tiene un único grupo de acoplamiento a la parte direccionadora, pero múltiples
 grupos reactivos capaces de reaccionar con un conjugado de fármaco-(primer enlazador), amplificando de esta
 manera la cantidad de moléculas del fármaco conjugadas con la parte direccionadora.

30 La invención se refiere, además a un procedimiento para preparar conjugados, en el que el enlazador se conjuga en
 primer lugar con un fármaco, produciendo de esta manera un conjugado de fármaco-enlazador; donde dicha
 preparación del conjugado de fármaco-enlazador implica la protección selectiva y desprotección de un grupo más
 reactivo en un fármaco que contiene múltiples grupos funcionales; donde dicho conjugado de fármaco-enlazador,
 opcionalmente, no está purificado; y donde dicho conjugado de fármaco-enlazador se conjuga en lo sucesivo con un
 anticuerpo o fragmento monoclonal.

35 El conjugado de la invención, tal y como se define en las reivindicaciones, resulta de utilidad en un método para el
 tratamiento del cáncer (de una neoplasia), una enfermedad autoinmunitaria, una infección o una lesión infecciosa
 con los conjugados que se describen en la presente. Las realizaciones alternativas se refieren a los conjugados de
 fármaco-parte direccionadora fabricados mediante los procedimientos y/o kits reivindicados para llevar a cabo los
 procedimientos reivindicados.

La invención se refiere, asimismo, a un inmunconjugado que comprende lo siguiente:

- 40 (a) una parte direccionadora;
- (b) una parte quimioterapéutica y
- (c) un enlazador unido covalentemente a la parte direccionadora mediante un grupo que se une a la parte
 direccionadora y a la parte quimioterapéutica mediante una parte escindible intracelularmente. En otra realización, la
 invención se refiere a un inmunconjugado que comprende lo siguiente:

- 45 (a) parte direccionadora;
- (b) una parte quimioterapéutica y
- (c) un enlazador unido covalentemente a la parte direccionadora mediante un grupo que se une a la parte
 direccionadora y a la parte quimioterapéutica, mediante una parte escindible intracelularmente; en el que

dicha unión del enlazador a la parte terapéutica comprende, asimismo, un L-aminoácido o un polipéptido constituido
 hasta por cuatro L-aminoácidos.

50 En un ejemplo, la parte escindible intracelularmente es un carbonato que comprende un grupo hidroxilo activado de
 la parte quimioterapéutica y una parte etanolamina sustituida o un alcohol 4-aminobencílico, y el último está unido,
 mediante su grupo amino, a un enlazador cruzado que termina en el grupo que se une a la parte direccionadora; y
 donde la parte etanolamina sustituida deriva de un L-aminoácido natural, donde el grupo de ácido carboxílico del
 último se reemplaza con una parte de hidroximetilo; y donde el alcohol 4-aminobencílico está opcionalmente
 55 sustituido con un grupo alquilo C₁-C₁₀ en la posición bencílica.

En otro ejemplo, la parte escindible intracelularmente es un carbonato que comprende un grupo hidroxilo activado de la parte quimioterapéutica y una parte etanolamina sustituida, y la última, mediante su grupo amino, está unida a un L-aminoácido o un polipéptido que comprende hasta cuatro partes de L-aminoácido; donde el término N está unido a un enlazador cruzado que termina en el grupo que se une a la parte direccionadora; y donde la parte etanolamina sustituida deriva opcionalmente de un L-aminoácido, donde el grupo de ácido carboxílico del último se reemplaza con una parte de hidroximetilo.

En otro ejemplo, la parte escindible intracelularmente es un carbonato que comprende un grupo hidroxilo activado de la parte quimioterapéutica y un alcohol 4-aminobencílico o alcohol 4-aminobencílico sustituido, sustituido con un grupo alquilo C₁-C₁₀ en la posición bencílica, y el último, mediante su grupo amino, se une a un L-aminoácido o un polipéptido que comprende hasta cuatro partes de L-aminoácido; donde el término N se une a un enlazador cruzado que termina en el grupo que se une a la parte direccionadora.

En ciertos ejemplos, un grupo amino de una parte quimioterapéutica se acopla al grupo hidroxilo activado de una parte de etanolamina sustituida y protegida con amina, o un alcohol 4-aminobencílico, y el último está unido, mediante su grupo amino, a un L-aminoácido o un polipéptido que comprende hasta cuatro partes de L-aminoácido; donde el término N se une a un enlazador cruzado que termina en el grupo que se une a la parte direccionadora; cuando dicha parte etanolamina sustituida deriva opcionalmente de un L-aminoácido, donde el grupo de ácido carboxílico de la última se reemplaza con una parte de hidroximetilo; y donde el alcohol 4-aminobencílico está sustituido opcionalmente con un grupo alquilo C₁-C₁₀ en la posición bencílica. El derivado farmacológico bifuncional se conjuga después con una parte direccionadora para obtener un inmunoconjugado como se debatió anteriormente. Al dirigirse al sitio de la enfermedad con el inmunoconjugado, el inmunoconjugado se endocitosa y se cataboliza para liberar la parte fármaco-enlazador; donde el grupo amino libre de la parte etanolamina sustituida facilita la liberación del fármaco libre por el ataque nucleofílico en el grupo carbonilo de la parte de carbamato.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Terapia preclínica *in vivo* de ratones atímicos sin pelo, portadores de un carcinoma pancreático humano Capan 1, con conjugados MAb-CL2A-SN-38.

Figura 2. Terapia preclínica *in vivo* de ratones atímicos sin pelo, portadores de un carcinoma pancreático humano BxPC3, con conjugados MAb-CL2A-SN-38.

Figura 3. Terapia preclínica *in vivo* de ratones atímicos sin pelo, portadores de un carcinoma de colon humano LS174T, con el conjugado hMN-14CL2A-SN-38.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En la descripción que sigue, se emplean varios términos y expresiones, y las definiciones expuestas a continuación se brindan para facilitar la comprensión del tema central reivindicado. Aquellos términos que no estén expresamente definidos aquí se emplean según sus significados simples y comunes.

Salvo que se indique lo contrario, uno/a o unas/unos se refiere a “uno o más elementos”.

Las expresiones aproximadamente/alrededor de se usa en este documento para hacer referencia a más o menos el diez por ciento (10 %) de un valor. Por ejemplo, “aproximadamente/alrededor de 100” se refiere a cualquier número entre 90 y 110.

La expresión parte direccionadora, tal y como se usa en la presente se refiere a una molécula, un complejo o agregado, que se une específica o selectivamente a una molécula, una célula, una partícula, un tejido o un agregado diana u objetivo. El experto comprenderá que la unión específica se refiere a la unión a un objetivo particular sin reactividad cruzada con otros objetivos, en tanto que unión selectiva se refiere a la unión preferencial a un objetivo particular. En realizaciones preferidas, una parte direccionadora es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico u otra molécula u otro compuesto basado en un anticuerpo. Sin embargo, otros ejemplos de partes direccionadoras son conocidos en la técnica y se pueden utilizar, tales como aptámeros, avímeros, ligandos de unión al receptor, ácidos nucleicos, pares de unión biotina-avidina, péptidos o proteínas de unión, etc. Las expresiones “parte direccionadora” y “parte de unión” se utilizan como sinónimos en la presente.

Un anticuerpo, tal y como se usa en la presente, se refiere a una molécula de inmunoglobulina de extensión completa (es decir, naturales o formadas por procedimientos de recombinación de genes de inmunoglobulina normal) (*por ejemplo*, un anticuerpo de IgG) o una porción de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina, tales como un fragmento de anticuerpo. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede estar conjugado u obtenerse de otro modo dentro del alcance del tema central reivindicado. Estos anticuerpos incluyen, aunque no taxativamente, IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4 (y las subformas IgG4), así como también los isotipos IgA.

Un fragmento de anticuerpo es una porción de un anticuerpo, tales como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv (Fv de

cadena única), anticuerpos de dominio único (DAB o VHH) y similares, incluidas las semi-moléculas de una IgG4 antes citada (van der Neut Kofschoten et al. (Science 2007; 317(14 de septiembre): 1554-1557). Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo que se utiliza se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. La frase "fragmento de anticuerpo" también incluye proteínas sintéticas o manipuladas genéticamente que actúan como un anticuerpo al unirse a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados que consisten en regiones variable, tales como los fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas, moléculas de polipéptidos unicatenarios recombinantes, donde las regiones variables livianas y pesadas se conectan mediante un péptido enlazador ("proteínas scFv"), y unidades mínimas de reconocimiento que consisten en residuos de aminoácidos que imitan la hiperregión variable, tales como las CDR. Los fragmentos Fv pueden estar contruidos de diferentes maneras, para proporcionar formas multivalentes y/o multiespecíficas de unión. En el caso de las multivalentes, tienen más de un sitio de unión contra el epítipo específico, en tanto que con las formas multiespecíficas, se une más de un epítipo (ya sea del mismo antígeno o contra un antígeno y un antígeno diferente). Tal y como se usa en la presente, la frase componente del anticuerpo incluye un anticuerpo entero, una proteína de fusión y sus fragmentos.

Un anticuerpo desnudo es, por lo general, un anticuerpo entero que no está conjugado a un agente terapéutico. Esto es así porque la porción Fc de la molécula del anticuerpo provee funciones efectoras o inmunológicas, tales como la fijación del complemento y ADCC (*antibody-dependent cell cytotoxicity*, citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo), que pone en acción los mecanismos que pueden resultar en la lisis celular. Sin embargo, la porción Fc puede no requerirse para la función terapéutica del anticuerpo, sino que más bien pueden entrar en acción, otros mecanismos, tales como apoptosis, anti-angiogénesis, actividad antimetastásica, actividad anti-adhesión, tales como inhibición de adhesión heterotípica u homotípica, e interferencia en las vías de señalización, e interferir con el avance de la enfermedad. Los anticuerpos desnudos incluyen tanto los anticuerpos policlonales y monoclonales, y sus fragmentos, que incluyen anticuerpos murinos, así como también, ciertos anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos y sus fragmentos. Por tanto, en algunos casos, el "anticuerpo desnudo" también se puede referir a un fragmento de anticuerpo "desnudo". Tal y como se define en la presente, "desnudo" es sinónimo de "no conjugado" y se refiere a que no está unido a un agente terapéutico ni conjugado con él.

Las enfermedades autoinmunitarias son trastornos ocasionados cuando el cuerpo produce una respuesta inmunitaria contra sus propios tejidos. Los ejemplos incluyen enfermedades autoinmunitarias de clase III, tales como: trombocitopenias inmunomediadas, púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, corea de Sydenham, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndrome poliglandular, penfigoide ampolloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nudosa, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía de IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangiítis obliterans, síndrome de Sjogren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, escleroderma, hepatitis activa crónica, artritis reumatoide, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva y alveolitis fibrosante, conforme se describe en la serie de solicitudes de patentes provisionarias de los EE. UU. con el número 60/360.259, presentada el 1 de marzo de 2002.

Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante que contiene los dominios variables tanto de la cadena pesada como de la cadena liviana del anticuerpo, lo cual incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementarity determining regions*) de un anticuerpo obtenido de una especie, preferiblemente un anticuerpo de roedor, más preferiblemente un anticuerpo murino, en tanto que los dominios constantes de la molécula del anticuerpo derivan de un anticuerpo humano. Para aplicaciones veterinarias, los dominios constantes del anticuerpo quimérico pueden obtenerse de otras especies, tales como de un primate, gato o perro.

Un anticuerpo humanizado es una proteína recombinante, en la que las CDR de un anticuerpo proveniente de una especie —por ejemplo, un anticuerpo murino— se transfieren desde las cadenas variables pesadas y livianas del anticuerpo murino hasta los dominios variables pesados y livianos humanos (regiones del marco). Los dominios constantes de la molécula del anticuerpo derivan de los de un anticuerpo humano. En ciertos casos, los residuos específicos de la región marco del anticuerpo humanizado, particularmente los que tocan las secuencias de las CDR o que están cerca de ellas, pueden modificarse —por ejemplo, reemplazarse— por los correspondientes residuos del anticuerpo original del murino, roedor, primate subhumano u otro anticuerpo.

Un anticuerpo humano es un anticuerpo que se obtiene, por ejemplo, de ratones transgénicos que se han "manipulado" para producir anticuerpos humanos en respuesta a un estímulo antigénico. En esta técnica, los elementos de los *loci* humanos de cadena pesada y liviana se introducen razas de ratones derivados de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones dirigidas de los *loci* endógenos de cadena pesada y cadena liviana. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para diversos antígenos, y los ratones se pueden usar para producir hibridomas que segregan anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos de los ratones transgénicos se describen en Green et al., Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), y Taylor et al., Int. Immun. 6:579 (1994). Un anticuerpo totalmente humano también se

puede construir por métodos de transfección genéticos o de cromosomas, así como también, por tecnología de presentación de fagos, siendo todos ellos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990) para la producción de anticuerpos humanos y sus fragmentos *in vitro*, a partir de los repertorios de genes de dominios variables de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. En esta técnica, los genes de dominios variables del anticuerpo se clonan en el marco, ya sea en un gen de proteína de recubrimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, y se exhibe en fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fagos. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma de fagos, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también derivan en la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe dichas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas propiedades de la célula B. La presentación de fagos se puede llevar a cabo en una variedad de formatos, para su revisión, véase por ejemplo Johnson y Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571 (1993). También se pueden generar anticuerpos humanos por células B activadas *in vitro*. Véanse, por ejemplo los documentos de patente de los EE. UU. con los números 5.567.610 y 5.229.275.

Enfermedades infecciosas, tal y como se usa en la presente, son enfermedades que implican una infección causada por patógenos, tales como bacteria, rickettsia, micoplasma, protozoos, hongos, virus, parásitos u otro agentes microbianos. Los ejemplos incluyen al virus de inmunodeficiencia humano (VIH) causante del sida, *Mycobacterium* de la tuberculosis, *Streptococcus agalactiae*, Staphylococcus aureus resistente a la meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, Pneumococcus, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Hemophilis influenzae B, Treponema pallidum, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, virus del Nilo Occidental, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, virus de la rabia, virus de la influenza, citomegalovirus, virus del herpes simple del tipo 1, virus del herpes simple del tipo 2, virus seudoparvo sérico humano, virus sincitial respiratorio, virus de varicela-zóster, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus del sarampión, adenovirus, virus de la leucemia de células T humana, virus Epstein-Barr, virus de la leucemia murina, virus de la parotiditis, virus de la estomatitis vesicular, virus de sindbis, virus de coriomeningitis linfocítica, virus de la verruga, virus de la lengua azul, virus Sendai, virus de la leucemia felina, reovirus, virus de la polio, virus 40 del simio, virus del tumor mamario del ratón, virus del dengue, virus de la rubéola, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, Toxoplasma gondii, Trypanosoma rangeli, Trypanosoma cruzi, Trypanosoma rhodesiensei, Trypanosoma brucei, Schistosoma mansoni, Schistosoma japonicum, Babesia bovis, Elmeria tenella, Onchocerca volvulus, Leishmania tropica, Trichinella spiralis, Theileria parva, Taenia hydatigena, Taenia ovis, Taenia saginata, Echinococcus granulosus, Mesocestoides corti, Mycoplasma arthritis, M. hyorhinitis, M. orale, M. arginini, Acholeplasma laidlawii, M. salivarium y M. pneumoniae. Puede encontrarse un listado revisado de anticuerpos contra organismos infecciosos (anticuerpos anti toxinas y antivirales), así como también otros dianas, en Casadevall, Clin Immunol 1999; 93(1):5-15.

Un agente terapéutico es una molécula o átomo que se administra por separado, de manera concurrente o secuencial con una parte de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o un subfragmento del mismo y es de utilidad en el tratamiento de una enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, aunque no de manera taxativa, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, conjugados, fármacos, agentes citotóxicos, agentes proapoptóticos, toxinas, nucleasas (incluidas las DNAsas y RNAsas), hormonas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes, radioisótopos o radionúclidos, oligonucleótidos, ARN de interferencia, péptidos, agentes antiangiogénicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, quimiocinas, prodrogas, enzimas, péptidos o proteínas de unión o sus combinaciones.

Un conjugado es un componente del anticuerpo u otra parte direccionadora conjugada a un agente terapéutico, tales como los que se han descrito anteriormente. Tal y como se usa en la presente, los términos "conjugado" e "inmunoconjugado" se usan como sinónimos.

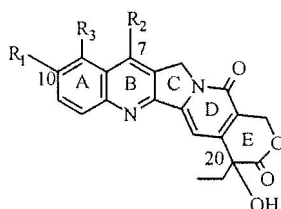
Tal y como se usa en la presente, la frase proteína de fusión del anticuerpo es una molécula que se une al antígeno producida por técnicas recombinantes en la cual uno o más anticuerpos naturales, anticuerpos de cadena simple o fragmentos de anticuerpos están unidos (fusionados) a otra parte, tales como una toxina de una proteína o de un péptido, citocinas, hormona, etc. En ciertas realizaciones preferidas, la proteína de fusión puede comprender dos o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos de cadena simple iguales o diferentes fusionados entre sí, que pueden unirse al mismo epítipo, a epítipos diferentes en el mismo antígeno o en antígenos diferentes. Una proteína de fusión del anticuerpo comprende al menos un sitio de unión al antígeno. La valencia de la proteína de fusión indica el número total de brazos o sitios de unión o que tiene la proteína de fusión con el o los antígenos o epítipos; es decir, monovalente, bivalente, trivalente o multivalente. La multivalencia de la proteína de fusión del anticuerpo significa que puede aprovechar las múltiples interacciones en la unión a un antígeno, incrementando así la avidez de unión al antígeno o a diferentes antígenos. La especificidad indica a cuántos tipos diferentes de antígeno o epítipo puede unirse una proteína de fusión del anticuerpo; es decir, monoespecífica, biespecífica, triespecífica, multiespecífica. Utilizando estas definiciones, un anticuerpo natural, por ejemplo, una IgG, es bivalente porque tiene dos brazos de unión, pero es monoespecífica porque se une a un tipo de antígeno o epítipo. Una proteína de fusión monoespecífica, multivalente tiene más de un sitio de unión para el mismo antígeno o epítipo. Por ejemplo, un diacuerpo monoespecífico es una proteína de fusión con dos sitios de unión reactivos con el mismo antígeno. La proteína de fusión puede comprender una combinación multivalente o multiespecífica de diferentes componentes del anticuerpo o múltiples copias del mismo componente del anticuerpo. La proteína de fusión puede

comprender, adicionalmente, un agente terapéutico.

Un inmunomodulador es un agente terapéutico que cuando está presente, altera, elimina o estimula el sistema inmunológico del organismo. Por lo general, un inmunomodulador para usar estimula las células inmunes para proliferar o activarse en una cascada de respuestas inmunitarias, tales como macrófagos, células dendríticas, células B y/o células T. Sin embargo, en ciertos casos un inmunomodulador puede suprimir la proliferación o activación de células inmunes, como en el tratamiento terapéutico de una enfermedad autoinmunitaria. Un ejemplo de un inmunomodulador como el que aquí se describe es una citocina, que es una pequeña proteína soluble de aproximadamente 5-20 kDa, que es liberada por una población celular (por ejemplo, linfocitos T cebados) en contacto con antígenos específicos, y que actúa como un mediador intercelular entre las células. Como lo comprenderá el experto, los ejemplos de citocinas incluyen linfocinas, monocinas, interleucinas y varias moléculas de señalización relacionadas, tales como factor de necrosis tumoral (TNF) e interferones. Las quimiocinas son un subconjunto de citocinas. Ciertas interleucinas e interferones son ejemplos de citocinas que estimulan la proliferación de células T u otras células inmunes.

CPT es la abreviatura de la camptotecina, y como se usa en la presente solicitud, la CPT representa la camptotecina en sí o un análogo o derivado de la camptotecina. Las estructuras de camptotecina y ciertos de sus análogos, con la numeración indicada y los anillos rotulados con las letras A-E, se proporcionan en la fórmula 1 en el siguiente gráfico 1.

Gráfico 1

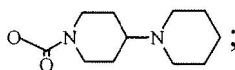


(1)

CPT: $R_1=R_2=R_3=H$

10-Hidroxi-CPT: $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$

CPT-11: $R_1 =$



$R_2 =$ etilo; $R_3 = H$

SN-38: $R_1 = OH$; $R_2 =$ etilo; $R_3 = H$

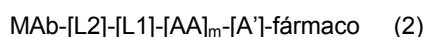
Topotecán: $R_1 = OH$; $R_2 = H$; $R_3 = CH_2-N(CH_3)_2$

Conjugados de camptotecina

Los métodos se han concebido de las siguientes maneras para la preparación de conjugados de fármacos quimioterapéuticos con partes direccionadoras (TM, *targeting moieties*), tales como un anticuerpo (MAb). Los métodos que se describen representan una realización preferida de la invención. (1) La solubilidad del fármaco se potencia al colocar una parte de polietilenglicol (PEG) definida (es decir, un PEG que contiene un número definido de unidades monoméricas) entre el fármaco y el vector direccionador, donde el PEG definido es un PEG de bajo peso molecular, preferiblemente que contiene de 1 a 30 unidades monoméricas, más preferiblemente, que contiene de 1 a 12 unidades monoméricas; (2) un primer enlazador conecta el fármaco en un extremo y termina con un acetileno o un grupo azida en el otro extremo; este primer enlazador comprende una parte de PEG definida con un grupo azida o acetileno en un extremo y un grupo reactivo diferente, tales como un ácido carboxílico o grupo hidroxilo, en el otro extremo y dicho PEG definido bifuncional se une al grupo amina de un alcohol amino, y el grupo hidroxilo del último se une al grupo hidroxilo en el fármaco en forma de un carbonato; de manera alternativa, la parte no azida(o acetileno) de dicho PEG definido bifuncional está unida opcionalmente al término N de un L-aminoácido o un polipéptido, con el término C unido al grupo amino del alcohol amino, y el grupo hidroxilo del último se une al grupo hidroxilo del fármaco en forma de carbonato o carbamato, respectivamente; (3) un segundo enlazador, que comprende un grupo de acoplamiento a la parte direccionadora y una parte reactiva complementaria del grupo azida (o acetileno) del primer enlazador, a saber acetileno (o azida), reacciona con el conjugado de fármaco-(primer enlazador) mediante la reacción de cicloadición de acetileno-azida para proveer el producto farmacológico bifuncional final, que es de utilidad para conjugarse con las partes direccionadoras de la enfermedad, tales como los

anticuerpos direccionadores de la enfermedad; (4) el grupo de acoplamiento al anticuerpo está concebido para que sea un tiol o bien un grupo reactivo de tiol; (5) los métodos se han diseñado para la regeneración selectiva del grupo 10-hidroxilo en presencia del carbonato C-20, en las preparaciones del precursor de fármaco-enlazador que involucran los análogos de CPT, tales como SN-38; (6) también se usan otros grupos protectores para los grupos hidroxilo reactivos, en fármacos tales como el hidroxilo fenólico en SN38, por ejemplo, tales como t-butildimetilsililo o t-butildifenilsililo, y estos son desprotegidos por el fluoruro de tetrabutilamonio antes de enlazar el derivado farmacológico con una parte de acoplamiento del vector direccionador; y (6) el grupo 10-hidroxilo de los análogos CPT se protege, de manera alternativa, como un éster o carbonato, distinto del 'BOC', de modo tal que el CPT bifuncional se conjuga con una parte direccionadora sin la previa desprotección de este grupo protector, y el grupo protector se desproteja fácilmente en condiciones fisiológicas de pH, después de administrar el bioconjugado. En el acoplamiento de acetileno-azida, denominado 'química clic', la parte de azida puede estar en el L2 con la parte de acetileno en L3. De manera alternativa, L2 puede contener acetileno, donde L3 contiene azida. 'Química clic' es una reacción de cicloadición catalizada con cobre (+1), entre una parte de acetileno y una parte de azida, y es una técnica relativamente reciente en las bioconjugaciones (Kolb HC y Sharpless KB, Drug Discov Today 2003; 8: 1128-37). La química clic tiene lugar en solución acuosa en condiciones de pH casi neutras, y es así susceptible para la conjugación de fármacos. La ventaja de la química clic reside en que es quimioselectiva, y complementa otras químicas de conjugación ampliamente conocidas, tales como la reacción de tiol-maleimida. En el siguiente debate, cuando un conjugado comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, puede sustituirse otro tipo de parte de unión, tal como un aptámero, avímero o péptido direccionador.

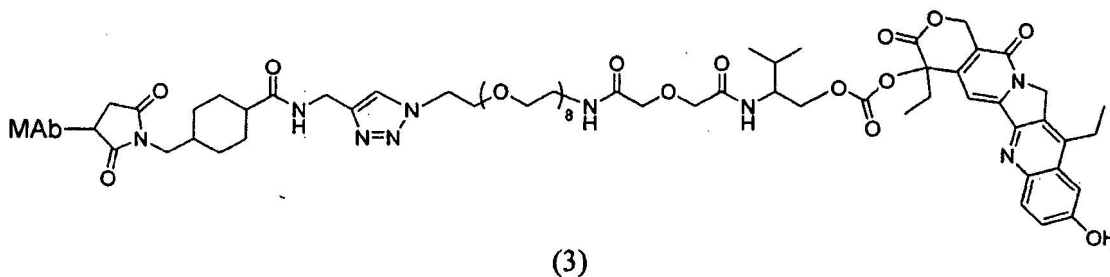
Un ejemplo se dirige a un conjugado de un derivado farmacológico y un anticuerpo de la fórmula general 2,



en la que MAb es un anticuerpo dirigido hacia una enfermedad; L2 es un componente del enlazador cruzado, que comprende una parte de acoplamiento al anticuerpo y uno o más de los grupos acetileno (o azida); L1 comprende un PEG definido con azida (o acetileno) en un extremo, complementario de la parte acetileno (o azida) en L2, y una parte reactiva, tales como un grupo ácido carboxílico o grupo hidroxilo en el otro extremo; AA es un L-aminoácido; m es un número entero con valores de 0, 1, 2, 3 o 4; y A' es un espaciador adicional, seleccionado del grupo que comprende etanolamina, alcohol 4-hidroxibencílico, alcohol 4-aminobencílico o etilendiamina sustituida o no sustituida. Los L-aminoácidos de 'AA' se seleccionan entre alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Si el grupo A' contiene hidroxilo, está unido al grupo hidroxilo o al grupo amino del fármaco, en forma de un carbonato o carbamato, respectivamente.

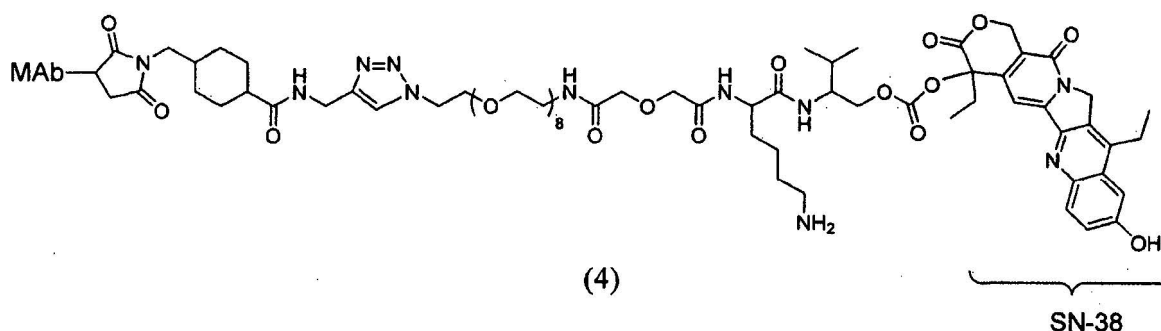
En un ejemplo preferido de la fórmula 2, A' es una etanolamina sustituida, derivada de un L-aminoácido, donde el grupo de ácido carboxílico de L-aminoácido se reemplaza por una parte de hidroximetilo. A' puede obtenerse de uno cualquiera de los siguientes L-aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

En un ejemplo del conjugado de la realización preferida de la fórmula 2, m es 0, A' es L-valinol y el fármaco se ejemplifica mediante SN-38. La estructura resultante se muestra en la fórmula 3.



40

En otro ejemplo del conjugado de la realización preferida de la fórmula 2, m es 1 y está representado por una L-lisina derivada, A' es L-valinol, y el fármaco se ejemplifica mediante SN-38. La estructura se muestra en la fórmula 4.

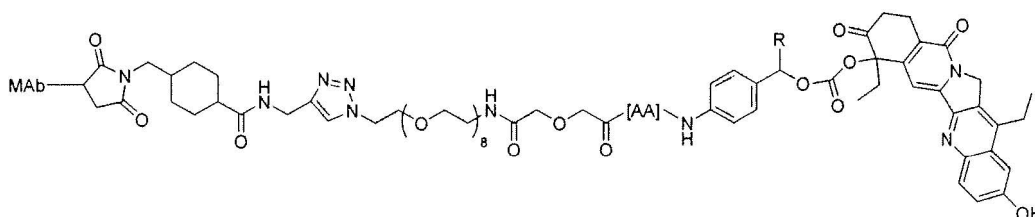


5 En este ejemplo, primero se forma una unión de amida entre el ácido carboxílico de un aminoácido, tal como lisina y el grupo amino de valinol, usando grupos protectores ortogonales para los grupos amino de lisina. El grupo protector en el término N de lisina se elimina, manteniendo el grupo protector de la cadena lateral de lisina intacta, y el término N se acopla al grupo carboxilo en el PEG definido con azida (o acetileno) en el otro extremo. El grupo hidroxilo de valinol luego se une al derivado de 20-clorofornato de SN-38 10-hidroxi-prottegido, y el intermediario se acopla al componente L2 que lleva el vector direccionador-la parte de unión, así como también el grupo acetileno complementario (o azida) involucrado en la química clic de cicloadición. Finalmente, la eliminación de grupos protectores tanto de la cadena lateral de la lisina como del SN-38 brinda el producto de este ejemplo, que se muestra en la fórmula 3.

15 Lejos de aceptar las limitaciones de la teoría, el producto SN-38 de bajo peso molecular (MW, *molecular weight*), a saber carbonato de valinol-SN-38, generado después de la proteólisis intracelular, tiene la vía adicional de liberación de SN-38 intacto mediante ciclización intramolecular, que implica el grupo amino de valinol y el carbonilo del carbonato.

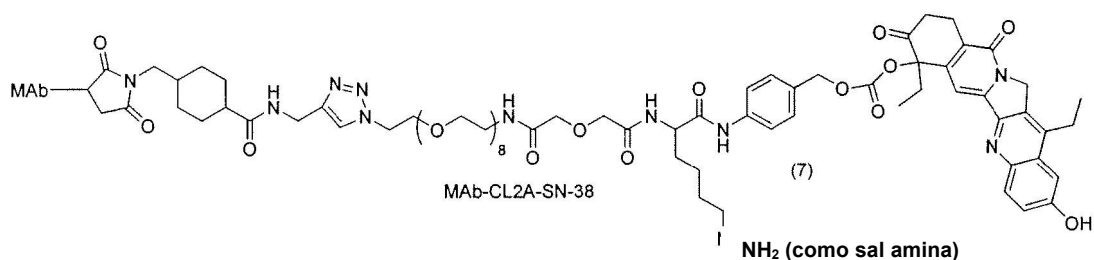
20 En otro ejemplo, A' de la fórmula general 2 es A-OH, por lo que A-OH es una parte plegable, tales como alcohol 4-aminobencílico o un alcohol 4-aminobencílico sustituido, sustituido con un grupo alquilo C₁-C₁₀ en la posición bencílica, y el último, mediante su grupo amino, se une a un L-aminoácido o un polipéptido que comprende hasta cuatro partes de L-aminoácido; donde el término N se une a un enlazador cruzado que termina en el grupo que se une a la parte direccionadora.

25 A continuación se brinda un ejemplo, en el que la realización A-OH de A' de la fórmula general (2) deriva de un alcohol 4-aminobencílico sustituido, y 'AA' comprende un solo L-aminoácido, donde m = 1 en la fórmula general (2), y el fármaco se ejemplifica con SN-38. La estructura se representa a continuación (fórmula 5, denominada MAb-CLX-SN-38). El único aminoácido de AA se selecciona entre uno cualquiera de los siguientes L-aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. El sustituyente R en la parte del alcohol 4-aminobencílico (realización A-OH de A') es hidrógeno o un grupo alquilo seleccionado de los grupos alquilo C₁-C₁₀.

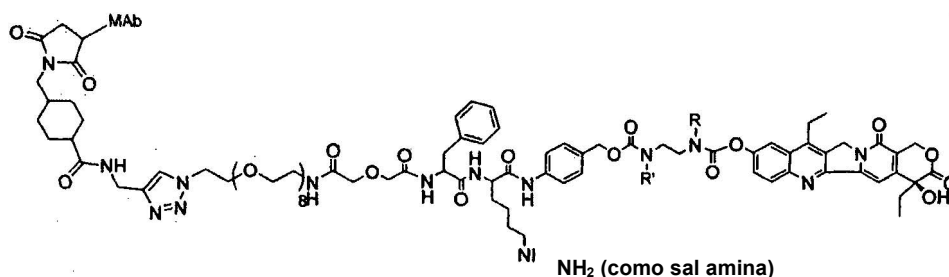


30

Una realización de MAb-CLX-SN-38 de la fórmula 5, en la que el único aminoácido AA es L-lisina y R = H, y el fármaco se ejemplifica mediante SN-38 (fórmula 6; denominado MAb-CL2A-SN-38).

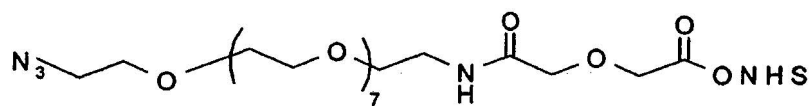


5 Otras realizaciones son posibles dentro del contexto de la camptotecinas que contienen 10-hidroxi, tales como SN-38. En el ejemplo de SN-38 como fármaco, se obtiene el grupo 10-hidroxi reactivo del fármaco dejando desactivado al grupo 20-hidroxilo. Dentro de la fórmula general 2, A' es una etilendiamina sustituida. Un ejemplo de esta
 10 realización está representada por la fórmula '7' ilustrada a continuación, donde el grupo hidroxilo fenólico de SN-38 se obtiene como un carbamato con una etilendiamina sustituida, con la otra amina de la diamina derivada como un carbamato con un alcohol 4-aminobencílico, y el grupo amino de la última se une a dipéptido Phe-Lys. En esta estructura (fórmula 7), R y R' son independientemente hidrógeno o metilo. Se denomina MAb-CL17-SN-38 o MAb-CL2E-SN-38, cuando R = R' = metilo.



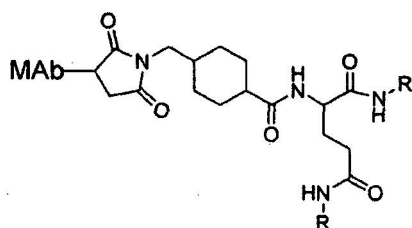
AA puede comprender una parte de polipéptido, preferiblemente un di, tri o tetrapéptido, que es escindible, por la peptidasa intracelular. Los ejemplos son: Ala-Leu, Leu-Ala-Leu y Ala-Leu-Ala-Leu (Trouet et al., 1982).

15 En otro ejemplo, el componente L1 del conjugado contiene un espaciador de polietilenglicol (PEG) definido con 1-30 unidades monoméricas de repetición. En otro ejemplo, el PEG es un PEG definido con 1-12 unidades monoméricas de repetición. La introducción de PEG puede involucrar el uso de derivados de PEG heterobifuncionalizados que
 20 están disponibles en plaza. El PEG heterobifuncional puede contener un grupo azida o acetileno. Un ejemplo de un PEG definido heterobifuncional que contiene 8 unidades monoméricas de repetición, donde 'NHS' es succinimidilo, se proporciona a continuación, en la fórmula 8:

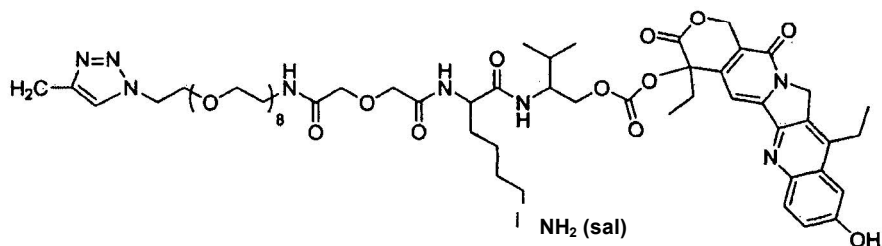


En un ejemplo, L2 tiene una pluralidad de grupos acetileno (o azida), que varían de 2-40, aunque preferiblemente, de 2-20 y, más preferiblemente, de 2-5, y una única parte de unión al vector de direccionamiento.

25 A continuación se muestra un conjugado SN-38 representativo de un anticuerpo que contiene múltiples moléculas farmacológicas y una única parte de unión al vector de direccionamiento. El componente 'L2' de esta estructura está colgado a 2 grupos acetilénicos, lo cual da como resultado la unión de dos moléculas SN-38 colgadas a la azida. La unión al MAb está representada como una succinimida.



Cuando el residuo R es:



(9)

En los ejemplos preferidos, cuando el fármaco bifuncional contiene un grupo reactivo tiol como el grupo de unión al anticuerpo, los tioles en el anticuerpo se generan en los grupos lisina del anticuerpo, usando un reactivo tiolante. Los métodos para introducir grupos tiol en los anticuerpos mediante modificaciones de los grupos lisina de los MAb son ampliamente conocidos en la técnica (Wong in Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1991), pp 20-22). De manera alternativa, la leve reducción de uniones de disulfuro intercadena en el anticuerpo (Willner et al., Bioconjugado Chem. 4:521-527 (1993)) usando agentes reductores tales como ditioneitol (DTT) puede generar 7 a 10 tioles en el anticuerpo, lo cual tiene la ventaja de incorporar múltiples partes farmacológicas en la región intercadenas del MAb, lejos de la región de unión al antígeno.

En un ejemplo, la parte quimioterapéutica se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina (DOX), epirrubicina, morfolinodoxorubicina (morfolino-DOX), cianomorfolino-doxorubicina (cianomorfolino-DOX), 2-pirrolinodoxorubicina (2-PDOX), CPT, 10-hidroxi camptotecina, topotecán, lurtotecán, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocampotecina, taxanos, geldanamicina, ansamicinas y epotilones. Según la invención, tal y como se define en las reivindicaciones, la parte quimioterapéutica es SN-38. Preferiblemente, en los conjugados de las realizaciones preferidas, la parte del anticuerpo se une al menos a una parte quimioterapéutica; preferiblemente a entre 1 y alrededor de 12 partes quimioterapéuticas; lo más preferiblemente a entre aproximadamente 6 y alrededor de 12 partes quimioterapéuticas.

Asimismo, en una realización preferida, el componente enlazador 'L2' comprende un grupo tiol que reacciona con un residuo tiol reactivo introducido en uno o más grupos aminos con cadena lateral de lisina de dicha parte direccionadora. En estos casos, el anticuerpo se obtiene en un paso previo con un grupo reactivo tiol, tales como una maleimida, vinilsulfona, bromoacetamida o iodoacetamida, mediante procedimientos que están muy bien descritos en la técnica.

En el contexto de estas realizaciones, se descubrió asombrosamente un procedimiento mediante el cual pueden prepararse enlazadores del fármaco CPT, donde la CPT tiene adicionalmente un grupo 10-hidroxilo. Este procedimiento implica, aunque no de manera taxativa, la protección del grupo 10-hidroxilo como un derivado de *t*-butiloxicarbonilo (BOC), seguido por la preparación del penúltimo intermediario del conjugado de fármaco-enlazador. Por lo general, la remoción del grupo BOC requiere el tratamiento con un ácido fuerte, tal como el ácido trifluoroacético (TFA, *trifluoroacetic acid*). En estas condiciones, el CPT 20-O-enlazador carbonato, que contiene los grupos protectores a eliminar, también es susceptible de la escisión, dando lugar a sí a una CPT no modificada. De hecho, la justificación para usar un grupo protector metoxitritilo (MMT) levemente removible para la cadena lateral de lisina de la molécula enlazadora, como se enuncia en la técnica, fue precisamente la de evitar esta posibilidad (Walker *et al.*, 2002). Se descubrió que la remoción selectiva del grupo protector BOC fenólico es posible llevando a cabo reacciones durante cortos períodos, óptimamente de 3 a 5 minutos. En estas condiciones, el producto predominante fue aquel en el se eliminó que el 'BOC' en la posición 10-hidroxilo, en tanto que el carbonato en la posición '20' estaba intacto.

Un abordaje alternativo implica proteger la posición 10-hidroxi del análogo de CPT con un grupo distinto del 'BOC', de manera tal que el producto final esté listo para la conjugación con los anticuerpos sin necesidad de desproteger el grupo protector 10-OH. El grupo protector 10-hidroxi, que convierte el 10-OH en un carbonato fenólico o un éster fenólico, puede desprotegerse fácilmente por las condiciones fisiológicas de pH o por esterasas después de la administración *in vivo* del conjugado. Esta eliminación más rápida de carbonato fenólico en la posición 10, en

comparación con un carbonato terciario en la posición 20 de la 10-hidroxycamptotecina en condiciones fisiológicas, ha sido descrita por He et al. (He et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12: 4003-4008 (2004)). Un grupo protector 10-hidroxi en SN-38 puede ser 'COR', en la que R puede ser un alquilo sustituido, tales como "N(CH₃)₂-(CH₂)_n-" en la que n es 1-10 y donde el grupo terminal amino se encuentra opcionalmente en forma de una sal cuaternaria para mejorar la solubilidad acuosa o un residuo alquilo simple, tales como "CH₃-(CH₂)_n-" en la que n es de 0-10, o puede ser una parte alcoxi, tal como "CH₃-(CH₂)_n-O-", en la que n es 0-10, o "N(CH₃)₂-(CH₂)_n-O-", en la que n es 2-10, o "R₁O-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₂-CH₂-O-", en la que R₁ es etilo o metilo, y n es un número entero, con valores de 0-10. Estos derivados 10-hidroxi se preparan fácilmente mediante el tratamiento con el cloroformato del reactivo escogido, si el derivado final debe ser un carbonato. Típicamente, la camptotecina que contiene 10-hidroxi, tales como SN-38 se trata con un equivalente del cloroformato en dimetilformamida, usando trietilamina como la base. En estas condiciones, la posición 20-OH no se ve afectada. Para formar los 10-O-ésteres, se emplea el cloruro ácido del reactivo escogido.

En un procedimiento ejemplar de la preparación de un conjugado de un derivado farmacológico y un anticuerpo de la fórmula general 2, donde los descriptores L2, L1, AA y A-X son tales como se han descrito en secciones anteriores, la parte bifuncional del fármaco, [L2]-[L1]-[AA]_m-[A-X]-fármaco se prepara en primer lugar, a lo cual sigue la conjugación de la parte bifuncional del fármaco a la parte direccionadora, TM [*targeting moiety*].

En un ejemplo procedimiento de la preparación de un conjugado de un derivado farmacológico y un anticuerpo de la fórmula general 2, donde los descriptores L2, L1, AA y A-OH son tales como se han descrito en secciones anteriores, la parte bifuncional del fármaco se preparan enlazando primero A-OH con el término C de AA, mediante una unión de amida, a lo cual sigue el acoplamiento del extremo de amina de AA a un grupo de ácido carboxílico de L1. Si AA está ausente (es decir, m = 0), A-OH se une directamente a L1, mediante una unión de amida. El entrecruzador, [L1]-[AA]_m-[A-OH], se une a un grupo amino o hidroxilo del fármaco y a esto sigue la unión a la parte L1, recurriendo a la reacción entre los grupos azida (o acetileno) y acetileno (o azida) en L1 y L2, mediante química clic.

En un ejemplo, la parte direccionadora, TM, es un anticuerpo monoclonal (MAb, *monoclonal antibody*). En otra realización, la parte direccionadora puede ser un MAb multivalente y/o multiespecífico. La parte direccionadora puede ser un anticuerpo monoclonal murino, quimérico, humanizado o humano, y dicho anticuerpo puede estar en forma intacta, como fragmento (Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂), o un subfragmento (constructos de cadena lateral) o de un isotipo de IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4, IgA, o sus submoléculas.

En otro ejemplo, la parte direccionadora es un anticuerpo monoclonal que es reactivo con un antígeno o epítipo de un antígeno expresado en una célula cancerosa o maligna. La célula cancerosa es, preferiblemente, una célula de un tumor hematopoyética, carcinoma, sarcoma, melanoma o un tumor glial. Una neoplasia preferida a tratar, según la presente invención, es un tumor sólido maligno o una neoplasia hematopoyética.

En una realización preferida, la parte escindible intracelularmente puede escindirse después de que se internaliza en la célula al unirse por el conjugado MAb-fármaco a un receptor del mismo y, particularmente, escindirse por esterasas y peptidasas.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo totalmente humano, no humano, humanizado o quimérico o un fragmento de un anticuerpo, incluidos los fragmentos producidos enzimáticamente o recombinantemente o proteínas de unión que incorporan secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos, fragmentos y proteínas de unión pueden ser multivalentes y multiespecíficos o multivalentes y mono-específicos, tal como se ha definido antes.

Técnicas generales de anticuerpos

Las técnicas para preparar anticuerpos monoclonales contra virtualmente cualquier antígeno diana son bien conocidas en este campo. Véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975), y Coligan et al. (eds.), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, VOL. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991). Brevemente, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse inyectando ratones con una composición que comprende un antígeno, eliminando el bazo para obtener los linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando los clones positivos que producen anticuerpos al antígeno, cultivando los clones que producen anticuerpos contra el antígeno, y aislando los anticuerpos de los cultivos del hibridoma.

Los MAb se pueden aislar y purificar a partir de cultivos del hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con la proteína-A o la proteína-G Sepharose, cromatografía por exclusión de tamaños, y cromatografía por intercambio de iones. Véase, por ejemplo, Coligan, en las páginas 2.7.1-2.7.12 y en las páginas 2.9.1-2.9.3. Véase también, Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, VOL. 10, páginas 79-104 (The Human Press, Inc. 1992).

Después de la elevación inicial de los anticuerpos al inmunógeno, los anticuerpos pueden secuenciarse y posteriormente, prepararse mediante técnicas recombinantes. La humanización y la quimerización de anticuerpos murinos y los fragmentos de anticuerpos son ampliamente conocidos para los expertos en la técnica, como se

explicará más adelante.

El experto advertirá que los métodos y las composiciones reivindicados pueden utilizar cualquiera de una amplia variedad de anticuerpos conocidos en la técnica. Los anticuerpos para usar son los comerciales, obtenidos entre una gran variedad de fuentes conocidas. Por ejemplo, puede hallarse una variedad de líneas de hibridomas que segregan anticuerpos del American Type Culture Collection [Colección Estadounidense de Cultivos Tipo] (ATCC, Manassas, VA). Se ha depositado en el ATCC un gran número de anticuerpos contra varios objetivos patológicos, que incluyen aunque no de manera taxativa, los antígenos asociados con el tumor y/o se han publicado secuencias de región variable y están disponibles para usar en los métodos y las composiciones reivindicados. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente de los EE. UU. con los números: 7.312.318; 7.282.567; 7.151.164; 7.074.403; 7.060.802; 7.056.509; 7.049.060; 7.045.132; 7.041.803; 7.041.802; 7.041.293; 7.038.018; 7.037.498; 7.012.133; 7.001.598; 6.998.468; 6.994.976; 6.994.852; 6.989.241; 6.974.863; 6.965.018; 6.964.854; 6.962.981; 6.962.813; 6.956.107; 6.951.924; 6.949.244; 6.946.129; 6.943.020; 6.939.547; 6.921.645; 6.921.645; 6.921.533; 6.919.433; 6.919.078; 6.916.475; 6.905.681; 6.899.879; 6.893.625; 6.887.468; 6.887.466; 6.884.594; 6.881.405; 6.878.812; 6.875.580; 6.872.568; 6.867.006; 6.864.062; 6.861.511; 6.861.227; 6.861.226; 6.838.282; 6.835.549; 6.835.370; 6.824.780; 6.824.778; 6.812.206; 6.793.924; 6.783.758; 6.770.450; 6.767.711; 6.764.688; 6.764.681; 6.764.679; 6.743.898; 6.733.981; 6.730.307; 6.720.15; 6.716.966; 6.709.653; 6.693.176; 6.692.908; 6.689.607; 6.689.362; 6.689.355; 6.682.737; 6.682.736; 6.682.734; 6.673.344; 6.653.104; 6.652.852; 6.635.482; 6.630.144; 6.610.833; 6.610.294; 6.605.441; 6.605.279; 6.596.852; 6.592.868; 6.576.745; 6.572.856; 6.566.076; 6.562.618; 6.545.130; 6.544.749; 6.534.058; 6.528.625; 6.528.269; 6.521.227; 6.518.404; 6.511.665; 6.491.915; 6.488.930; 6.482.598; 6.482.408; 6.479.247; 6.468.531; 6.468.529; 6.465.173; 6.461.823; 6.458.356; 6.455.044; 6.455.040; 6.451.310; 6.444.206; 6.441.143; 6.432.404; 6.432.402; 6.419.928; 6.413.726; 6.406.694; 6.403.770; 6.403.091; 6.395.276; 6.395.274; 6.387.350; 6.383.759; 6.383.484; 6.376.654; 6.372.215; 6.359.126; 6.355.481; 6.355.444; 6.355.245; 6.355.244; 6.346.246; 6.344.198; 6.340.571; 6.340.459; 6.331.175; 6.306.393; 6.254.868; 6.187.287; 6.183.744; 6.129.914; 6.120.767; 6.096.289; 6.077.499; 5.922.302; 5.874.540; 5.814.440; 5.798.229; 5.789.554; 5.776.456; 5.736.119; 5.716.595; 5.677.136; 5.587.459; 5.443.953; 5.525.338. Estos se brindan solo a modo de ejemplo, pues hay una gran variedad de otros anticuerpos y sus hibridomas son conocidos en la técnica. El experto advertirá que las secuencias de anticuerpos o los hibridomas que segregan anticuerpos contra casi cualquier antígeno asociado con la enfermedad pueden obtenerse mediante una simple búsqueda en las bases de datos de ATCC, NCBI [National Center for Biotechnology Information, Centro Nacional para la Información Biotecnológica] y/o la USPTO [United States Patent and Trademark Office, Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos] para anticuerpos contra un objetivo asociado con una enfermedad seleccionado de interés. Los dominios de unión al antígeno de los anticuerpos clonados pueden amplificarse, removerse, ligarse en un vector de expresión, transfectarse en una célula hospedadora adaptada y usarse para la producción de proteínas, usando técnicas estándar ampliamente conocidas en la técnica. Los anticuerpos aislados pueden conjugarse con agentes terapéuticos, tales como camptotecinas, usando las técnicas allí descritas.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante en la que las regiones variables de un anticuerpo humano se han reemplazado por las regiones variables, por ejemplo, de un anticuerpo de ratón, que incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementarity-determining regions*) del anticuerpo de ratón. Los anticuerpos quiméricos exhiben una menor inmunogenia y una mayor estabilidad cuando se administran a un sujeto. Los métodos para construir anticuerpos quiméricos son ampliamente conocidos en la técnica (por ejemplo, Leung et al., 1994, *Hibridoma* 13:469).

Un anticuerpo monoclonal quimérico puede humanizarse por transferencia de las CDR de ratón desde las cadenas variables pesadas y livianas de la inmunoglobulina de ratón hasta los correspondientes dominios variables de un anticuerpo humano. Las regiones de marco (FR, *framework regions*) de ratón en el anticuerpo monoclonal quimérico también se reemplazan con secuencias de FR humanas. Para preservar la estabilidad y la especificidad del antígeno del monoclonal humanizado, uno o más residuos FR humanos pueden remplazarse por residuos de la contrapartida de ratón. Los anticuerpos monoclonales humanizados pueden usarse para el tratamiento terapéutico de los sujetos. Las técnicas para la producción de anticuerpos humanizados monoclonales son ampliamente conocidas en esta área. (Véanse, por ejemplo, Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534; Carter et al., 1992, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:4285; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.*, 1992, 12:437; Tempest et al., 1991, *Biotechnology* 9:266; Singer et al., *J. Immun.*, 1993, 150:2844.)

Otras realizaciones pueden referirse a los anticuerpos de primates no humanos. Las técnicas generales para estimular anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos pueden hallarse, por ejemplo, en Goldenberg et al., documento de patente número WO 91/11465 (1991), y en Losman et al., *Int. J. Cancer* 46: 310 (1990). En otra realización, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos pueden obtenerse a partir de ratones transgénicos que se han diseñado por ingeniería para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta al estímulo antigénico, como se describirá a continuación.

Anticuerpos humanos

Los métodos para producir anticuerpos totalmente humanos usando ya sea abordajes de combinación o animales

transgénicos transformados con *loci* de inmunoglobulina humana son conocidos en la técnica (por ejemplo, Mancini et al., 2004, *New Microbiol.* 27:315-28; Conrad y Scheller, 2005, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:117-26; Brekke y Loset, 2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50). Se espera que tales anticuerpos totalmente humanos exhiban aun menos efectos secundarios que los anticuerpos quiméricos o humanizados y que actúen *in vivo* como anticuerpos humanos esencialmente endógenos. En ciertas realizaciones, los métodos y los procedimientos reivindicados pueden utilizar anticuerpos humanos producidos por tales técnicas.

En una alternativa, la técnica de exhibición de fagos se puede usar para generar anticuerpos humanos (por ejemplo, Dantas-Barbosa et al., 2005, *Genet. Mol. Res.* 4:126-40). Los anticuerpos humanos pueden generarse a partir de humanos normales o de humanos que exhiben un estado patológico particular, tales como el cáncer (Dantas-Barbosa et al., 2005). La ventaja de construir anticuerpos humanos a partir de una enfermedad individual reside en que el repertorio de anticuerpos circulantes puede desviarse hacia los anticuerpos contra los antígenos asociados con la enfermedad.

En un ejemplo no limitativo de esta metodología, Dantas-Barbosa et al. (2005) construyeron una biblioteca de exhibición de fagos de fragmentos de anticuerpos Fab humanos de pacientes con osteosarcoma. Por lo general, el ARN total se obtuvo de los linfocitos de la sangre circulante (*Id.*) Los Fab recombinantes fueron clonados a partir de los repertorios de anticuerpos de las cadenas μ , γ y κ e insertados en una biblioteca de exhibición de fagos (*Id.*) Los ARN se convirtieron en ADNc y se usaron para hacer bibliotecas de ADNc de los Fab usando cebadores específicos contra las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y liviana (Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97). La construcción de la biblioteca se llevó a cabo según Andris-Widhopf et al. (2000, In: *Exhibición de fagos Laboratory Manual*, Barbas et al. (eds), 1st edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 9.1 to 9.22). Los fragmentos finales del Fab se digirieron con endonucleasas de restricción y se insertaron en el genoma del bacteriófago para crear la biblioteca de exhibición de fagos. Tales bibliotecas pueden seleccionarse por métodos estándar de exhibición de fagos. El experto advertirá que esta técnica es solo ejemplar y que es posible utilizar cualquier método conocido para hacer y seleccionar anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos por exhibición de fagos.

En otra alternativa, los animales transgénicos que se han manipulado genéticamente para producir anticuerpos humanos pueden usarse para generar anticuerpos contra esencialmente cualquier agente inmunogénico, usando protocolos estándar de inmunización, como se describió anteriormente. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos fueron descritos por Green et al., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg et al., *Nature* 368:856 (1994), y Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579 (1994). Un ejemplo no limitativo de dicho sistema es el XenoMouse® (por ejemplo, Green et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23) de Abgenix (Fremont, CA). En los animales XenoMouse® y otros similares, los genes del anticuerpo de ratón se han inactivado y reemplazado por genes de anticuerpo humano funcionales, en tanto que el resto del sistema inmunitario de ratón permanece intacto.

El XenoMouse® se transformó con YAC (*yeast artificial chromosomes*, cromosomas artificiales de la levadura) configurados de la línea germinal que contenían porciones de los *loci* de IgH e Ig kappa humanos, incluso la mayoría de las secuencias de las regiones variables, junto con los genes accesorios y las secuencias regulatorias. El repertorio de regiones variables humanas puede usarse para generar células B que produzcan anticuerpos, que pueden procesarse para convertirse en hibridomas por técnicas conocidas. Un XenoMouse® inmunizado con un antígeno diana producirá anticuerpos humanos mediante una respuesta inmunitaria normal, que se pueden cosechar y/o producir por técnicas estándar, como las descritas anteriormente. Se encuentra disponible una variedad de razas de XenoMouse®, cada una de las cuales es capaz de producir una clase diferente de anticuerpo. Los anticuerpos humanos producidos transgénicamente han demostrado poseer un potencial terapéutico, al tiempo que retienen las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos humanos normales (Green et al., 1999). El experto advertirá que las composiciones y los métodos reivindicados no se limitan al uso del sistema XenoMouse® aunque puede utilizar cualquier animal transgénico que se haya diseñado genéticamente para producir anticuerpos humanos.

Producción de fragmentos de anticuerpos

Ciertas realizaciones de los métodos y/o las composiciones reivindicados pueden referirse a fragmentos de anticuerpos. Tales fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse, por ejemplo, por digestión de la pepsina o papaína de anticuerpos enteros, por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proveer un fragmento 5S indicado como F(ab')₂. Este fragmento puede volver a escindirse usando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo, resultantes de la escisión de los enlaces de disulfuro, para producir fragmentos monovalentes de 3.5S Fab'. De manera alternativa, una escisión enzimática que emplea pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc. Los métodos ejemplares para producir fragmentos de anticuerpos se describen en el documento de patente de los EE. UU. con el número 4.036.945; en el documento de patente de los EE. UU. con el número 4.331.647; Nisonoff et al., 1960, *Arch. Biochem. Biophys.*, 89:230; Porter, 1959, *Biochem. J.*, 73:119; Edelman et al., 1967, *METHODS IN ENZYMOLOGY*, page 422 (Academic Press), y Coligan et al. (eds.), 1991, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, (John Wiley & Sons).

También pueden usarse otros métodos para escindir anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena pesada-liviana, nueva escisión de fragmentos u otras técnicas

enzimática, química o genética, toda vez que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L . Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al., 1972, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 69:2659. De manera alternativa, las cadenas variables pueden enlazarse mediante una unión de disulfuro intermolecular o entrecruzarse con químicos, tales como glutaraldehído. Véase Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437.

Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un péptido enlazador. Estas proteínas que se unen al antígeno monocatenario (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L , conectados mediante una secuencia enlazadora de oligonucleótidos. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que posteriormente se introduce en una célula hospedadora, tales como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena de polipéptido con un péptido enlazador que forma un puente entre los dos dominios V. Los métodos para producir los scFv son ampliamente conocidos en la técnica. Véase Whitlow et al., 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97; Bird et al., 1988, Science, 242:423; documento de patente de los EE. UU. con el número 4,946,778; Pack et al., 1993, Bio/Technology, 11:1271, y Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de dominio único (dAb, *single domain antibody*), denominado en ocasiones anticuerpo de cadena única. Las técnicas para producir anticuerpos de dominios únicos son ampliamente conocidas en esta área (véase, por ejemplo, Cossins et al., Protein Expression and Purification, 2007, 51:253-59; Shuntao et al., Molec Immunol 2006, 43:1912-19; Tanha et al., J. Biol. Chem. 2001, 276:24774-780). Otros tipos de fragmentos de anticuerpos pueden comprender una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los péptidos de las CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden obtenerse construyendo genes que codifican las CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de la células productoras de los anticuerpos. Véase Larrick et al., 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106; Ritter et al. (eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, pages 166-179 (Cambridge University Press); Birch et al., (eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, pages 137-185 (Wiley-Liss, Inc.).

Variaciones de anticuerpos

En ciertas realizaciones, las secuencias de anticuerpos, tales como las porciones Fc de los anticuerpos, pueden variarse, para optimizar las características fisiológicas de los conjugados, tales como la semivida en suero. Los métodos para sustituir secuencias de aminoácidos en las proteínas son muy conocidos en la técnica, tales como por mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo Sambrook et al., Molecular Cloning, a laboratory manual, 2.^a Ed, 1989). En las realizaciones preferidas, la variación puede implicar la adición o eliminación de uno más sitios de glicosilación en la secuencia de Fc (por ejemplo, documento de patente de los EE. UU. con el número 6.254.868). En otras realizaciones preferidas, pueden hacerse sustituciones específicas de aminoácidos en la secuencia de Fc (por ejemplo, Hornick et al., 2000, J Nucl Med 41:355-62; Hinton et al., 2006, J Immunol 176:346-56; Petkova et al. 2006, Int Immunol 18:1759-69; documento de patente de los EE. UU. con el número 7.217.797).

Anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son de utilidad en varias aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico con sitios de unión para un antígeno de la superficie de la célula tumoral y para un receptor de la superficie de las células T puede dirigir la lisis de las células tumorales específicas por las células T. Los anticuerpos biespecíficos que reconocen los gliomas y el epítipo de la CD3 en las células T se han usado con éxito en el tratamiento de tumores cerebrales en pacientes humanos (Nitta, et al. Lancet. 1990; 355:368-371). En ciertas realizaciones, las técnicas y las composiciones para la conjugación de agentes terapéuticos explicadas en la presente memoria descriptiva pueden usarse con anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos como partes direccionadoras.

Se conocen numerosos métodos para producir anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, tal como se explica, por ejemplo, en el documento de patente de los EE. UU. con el número 7.405.320. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por el método del cuadro, que implica la fusión de dos hibridomas diferentes, cada uno de los cuales produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio antigénico diferente (Milstein y Cuello, Nature, 1983; 305:537-540).

Otro método para producir anticuerpos biespecíficos emplea enlazadores cruzados heterobifuncionales para enlazarse químicamente con dos anticuerpos monoclonales diferentes (Staerz, et al. Nature. 1985; 314:628-631; Perez, et al. Nature. 1985; 316:354-356). Los anticuerpos biespecíficos también se pueden producir por reducción de cada uno de los anticuerpos monoclonales de origen para resolver las respectivas hemimoléculas, que luego se mezclan y se las deja para que vuelvan a oxidarse, a fin de obtener la estructura híbrida (Staerz y Bevan. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83:1453-1457). Otra alternativa implica el entrecruzar químicamente dos o tres fragmentos Fab' purificados por separado, usando enlazadores apropiados. (Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea número 0453082).

Otros métodos incluyen mejorar la eficiencia de generar hibridomas híbridos por transferencia genética de marcadores distintivos seleccionables mediante vectores lanzadera derivados de retrovirus en los respectivos hibridomas progenitores, que posteriormente se fusionan (DeMonte, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1990, 87:2941-2945); o transfección de una línea celular del hibridoma con plásmidos de expresión que contienen genes de cadena pesada y liviana de un anticuerpo diferente.

Los dominios cognados V_H y V_L pueden unirse con un péptido enlazador de una composición y longitud apropiados (por lo general, consistente en más de 12 residuos de aminoácidos) para formar un Fv de cadena única (scFv, *single chain Fv*) con actividad de unión. Los métodos de fabricación de los scFv se describen en el documento de patente de los EE. UU. con el número 4.946.778 y en el documento de patente de los EE. UU. con el número 5.132.405. La reducción de la extensión del péptido enlazador a menos de 12 residuos de aminoácidos previene el apareamiento de los dominios V_H y V_L en la misma cadena y fuerza el apareamiento de los dominios V_H y V_L con dominios de complementariedad en otras cadenas, lo cual da como resultado la formación de multímeros funcionales. Las cadenas polipeptídicas de los dominios V_H y V_L que se unen con los enlazadores entre los residuos de aminoácidos 3 y 12 forman predominantemente dímeros (denominados diacuerpos). Con los enlazadores, se favorecen entre 0 y 2 residuos de aminoácidos, trímeros (denominados triacuerpos) y tetrameros (denominados tetracuerpos), aunque los patrones exactos de oligomerización parecen depender de la composición, así como también, de la orientación de los dominios V (V_H -enlazador- V_L o V_L -enlazador- V_H), además de la longitud del enlazador.

Estas técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos denotan diversas dificultades en términos de bajos rendimientos, necesidad de recurrir a la purificación, baja estabilidad o un exigente trabajo de mano de obra de la técnica. En los últimos tiempos, se ha empleado una técnica conocida como "dock and lock" (DNL) [acople de seguridad] para producir combinaciones de virtualmente cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras moléculas efectoras que se desean (véanse, por ejemplo, los documentos de patente de los EE. UU. con los números 7.550.143; 7.521.056; 7.534.866; 7.527.787 y USSN 11/925.408). La técnica emplea dominios complementarios de unión a la proteína, denominados dominios de anclaje (AD, *anchoring domains*) y dominios de dimerización y acople (DDD, *dimerization and docking domains*), que se unen entre sí y permiten el ensamblaje de las estructuras del complejo, que varían entre dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros y hexámeros. Estos forman complejos estables con un alto rendimiento, sin requerir una purificación exhaustiva. La técnica DNL permite el ensamblaje de anticuerpos monoespecíficos, biespecíficos o multiespecíficos. Es posible utilizar cualquiera de las técnicas conocidas en el campo de fabricar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos en la práctica de los métodos reivindicados en esta memoria descriptiva.

En diversas realizaciones, un conjugado tal como se explica en la presente memoria descriptiva puede ser parte de un anticuerpo multiespecífico compuesto. Tales anticuerpos pueden contener dos o más sitios de unión al antígeno que sean diferentes, con especificidades distintas. El compuesto multiespecífico puede unirse a diferentes epítomos del mismo antígeno o, de manera alternativa, puede unirse a dos antígenos diferentes. Algunas de las combinaciones direccionadoras que más se prefieren son las enumeradas en la tabla 1. Esta es una lista de ejemplos de las combinaciones preferidas, pero no pretende ser exhaustiva.

Tabla 1. Algunos ejemplos de anticuerpos multiespecíficos.

Primera diana	Segunda diana
MIF	Una segunda citocina efectora proinflamatoria, especialmente HMGB-1, TNF- α , IL-1 o IL-6
MIF	Quimiocina efectora proinflamatoria, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
MIF	Receptor efector proinflamatorio, especialmente IL-6R, IL-13R y IL-15R
MIF	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
MIF	Factor de complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
MIF	Proteína regulatoria de complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
MIF	Antígeno o receptor asociado con el cáncer
HMGB-1	Una segunda citocina efectora proinflamatoria, especialmente MIF, TNF- α , IL-1 o IL-6
HMGB-1	Quimiocina efectora proinflamatoria, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
HMGB-1	Receptor efector proinflamatorio, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
HMGB-1	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
HMGB-1	Factor de complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a

HMGB-1	Proteína regulatoria de complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
HMGB-1	Antígeno o receptor asociado con el cáncer
TNF- α	Una segunda citocina efectora proinflamatoria, especialmente MIF, HMGB-1, TNF- α , IL-1 o IL-6
TNF- α	Quimiocina efectora proinflamatoria, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
TNF- α	Receptor efector proinflamatorio, especialmente IL-6R IL-13R y IL-15R
TNF- α	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
TNF- α	Factor de complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
TNF- α	Proteína regulatoria de complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
TNF- α	Antígeno o receptor asociado con el cáncer
LPS	Citocina efectora proinflamatoria, especialmente MIF, HMGB-1, TNF- α , IL-1 o IL-6
LPS	Quimiocina efectora proinflamatoria, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
LPS	Receptor efector proinflamatorio, especialmente IL-6R IL-13R y IL-15R
LPS	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
LPS	Factor de complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
LPS	Proteína regulatoria de complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
TF o trombina	Citocina efectora proinflamatoria, especialmente MIF, HMGB=1, TNF- α , IL-1 o IL-6
TF o trombina	Quimiocina efectora proinflamatoria, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
TF o trombina	Receptor efector proinflamatorio, especialmente IL-6R IL-13R y IL-15R
TF o trombina	Factor de complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
TF o trombina	Proteína regulatoria de complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
TF o trombina	Antígeno o receptor asociado con el cáncer

Otras combinaciones más, tales como las preferidas para las terapias contra el cáncer, incluyen anticuerpos CD20 + CD22, anticuerpos CD74 + CD20, anticuerpos CD74 + CD22, anticuerpos CEACAM5 (CEA) + CEACAM6 (NCA), factor de crecimiento del tipo insulina (ILGF, *insulin-like growth factor*) + anticuerpos CEACAM5, EGP-1 (por ejemplo, RS-7) + anticuerpos ILGF, anticuerpos CEACAM5 + EGFR. Tales anticuerpos no solo deben usarse en combinación, sino que se los puede combinar como proteínas de fusión de varias formas, tales como IgG, Fab, scFv, y similares, según se describe en los documentos de patente de los EE. UU. con los números 6.083.477; 6.183.744 y 6.962.702 y en la publicación de solicitudes de patente de los EE. UU. con los números 20030124058; 20030219433; 20040001825; 20040202666; 20040219156; 20040219203; 20040235065; 20050002945; 20050014207; 20050025709; 20050079184; 20050169926; 20050175582; 20050249738; 20060014245 y 20060034759.

Antígenos diana y anticuerpos ejemplares

En una realización preferida, se usan anticuerpos que reconocen o se unen a los marcadores o antígenos asociados con el tumor que se expresan en niveles elevados en las células diana y que se expresan predominantemente o solo en las células enfermas y no en los tejidos normales, y anticuerpos que se internalizan rápidamente. Los anticuerpos útiles dentro del alcance de la presente invención incluyen MAb con propiedades tales como las que se han descrito anteriormente (y muestran propiedades distintivas de los diferentes niveles de internalización en las células y microorganismos), y contemplan el uso, aunque no de manera taxativa, en el cáncer, de los siguientes MAbs: LL1 (anti-CD74), LL2 y RFB4 (anti-CD22), RS7 (anti-glicoproteína epitelial 1 (EGP-1, *anti-epithelial glycoprotein-1*)), PAM4 y KC4 (ambos anti-mucina), MN14 (antígeno anti-carcinoembrionario (CEA [*anti-carcinoembryonic antigen*]), también conocido como CD66e), Mu-9 (antígeno-p anti-colon específico), Immu 31 (una antialfa-fetoproteína), TAG-72 (por ejemplo, CC49), Tn, J591 o HuJ591 (anti-PSMA (*prostate-specific membrane antigen*, antígeno de la membrana específico de la próstata)), ABPG1-XG1-026 (anti-dímero de PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (un IX MAb anti-anhidrasa carbónica) y hL243 (anti-HLADR). Tales anticuerpos son conocidos en la técnica (por ejemplo,

por los documentos de patente de los EE. UU. con los números 5.686.072; 5.874.540; 6.107.090; 6.183.744; 6.306.393; 6.653.104; 6.730.300; 6.899.864; 6.926.893; 6.962.702; 7.074.403; 7.230.084; 7.238.785; 7.238.786; 7.256.004; 7.282.567; 7.300.655; 7.312.318; y las publicaciones de solicitudes de patente de los EE. UU. con los números 20040185053; 20040202666; 20050271671; 20060193865; 20060210475; 20070087001.) Los anticuerpos conocidos específicos para usar incluyen: hPAM4 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7.282.567), hA20 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7.251.164), hA19 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7.109.304), hIMMU31 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7.300.655), hLL1 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7.312.318.), hLL2 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7.074.403), hMu-9 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7.387.773), hL243 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7.612.180), hMN-14 (documento de patente de los EE. UU. con el número 6.676.924), hMN-15 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7.541.440), hR1 (solicitud de patente provisoria de los EE. UU. 61/145.896), hRS7 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7.238.785), hMN-3 (documento de patente de los EE. UU. con el número 7,541,440), AB-PG1XG1-026 (solicitud de patente de los EE. UU. 11/983,372, depositada como ATCC PTA-4405 y PTA-4406) y D2/B (WO 2009/130575).

Otros antígenos de utilidad que se pueden tomar como objetivo usando los conjugados descritos incluyen anhidrasa carbónica IX, B7, CCCL19, CCCL21, CSAp, HER-2/*neu*, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20 (por ejemplo, C2B8, hA20, 1F5 MAbs), CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM5, CEACAM6, alfa-fetoproteína (AFP), VEGF (por ejemplo, AVASTIN®, variante de escisión de la fibronectina), ED-B fibronectina (por ejemplo, L19), EGP-1, EGP-2 (por ejemplo, 17-1A), receptor de EGF (ErbB1) (por ejemplo, ERBITUX®), ErbB2, ErbB3, Factor H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, Ga 733, GROB, HMGB-1, factor inducible de la hipoxia (HIF), HM1.24, HER-2/*neu*, factor de crecimiento del tipo insulina (IGF), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-2R, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, L-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, IGF-1R, Ia, HM1.24, gangliósidos, HCG, el antígeno de HLA-DR al que se une L243, los antígenos CD66, es decir, CD66a-d o una combinación de ellos, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, factor de crecimiento de la placenta (PIGF), PSA (antígeno prostático específico), PSMA, antígeno de PAM4, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM, KS1, Le(y), mesotelina, S100, tenascina, TAC, antígeno de Tn, antígenos de Thomas-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, antígenos de angiogénesis tumoral, TNF- α , receptor de TRAIL (R1 y R2), VEGFR, RANTES, T101, así como también, antígenos de células madre cancerígenas, factores de complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, y un producto oncogénico.

Los antígenos CD66 consisten en cinco glicoproteínas diferentes, con estructuras similares, CD66a-e, codificadas por los miembros de la familia de genes del antígeno (CEA, *carcinoembryonic antigen*), BCG, CGM6, NCA, CGM1 y CEA, respectivamente. Estos antígenos CD66 (por ejemplo, CEACAM6) se expresan principalmente en los granulocitos, en las células epiteliales normales del tubo digestivo y en las células tumorales de diversos tejidos. También se incluyen como dianas adecuadas para los cánceres los antígenos cáncer-testículo, tales como NY-ESO-1 (Theurillat et al., Int. J. Cancer 2007; 120(11):2411-7), así como también CD79a en la leucemia mieloide (Kozlov et al., Cancer Genet. Cytogenet. 2005; 163(1):62-7) y also también enfermedades de las células B, y CD79b para el linfoma no Hodgkin (Poison et al., Blood 110(2):616-623). Se describen varios los antígenos antes citados en la de solicitudes de patentes provisionarias de los EE. UU. con el número 60/426,379, titulada "Uso de complejos de multiespecíficos, no covalentes para el suministro dirigido de los terapéuticos", presentada el 15 de noviembre de 2002. Las células madre del cáncer, que se les atribuye ser poblaciones de células malignas precursoras más resistentes a la terapia (Gan, J Cell Mol. Med. 2007 Dec 5 [Epub ahead de print]; Hill y Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99(19):1435-40), tienen antígenos que pueden dirigirse a ciertos tipos de cáncer, tales como CD133 en el cáncer de próstata (Maitland et al., Ernst Schering Found. Sympos. Proc. 2006; 5:155-79), cáncer de pulmón no microcítico (Donnenberg et al., J. Control Release 2007; 122(3):385-91), y glioblastoma (Beier et al., Cancer Res. 2007; 67(9):4010-5), y CD44 en el cáncer colorrectal (Dalerba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(24):10158-63), cáncer pancreático (Li et al., Cancer Res. 2007; 67(3):1030-7), y en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Prince et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(3):973-8).

En la terapia de mieloma múltiple, se han descrito anticuerpos direccionadores adecuados contra, por ejemplo, CD38 y CD138 (Stevenson, Mol Med 2006; 12(11-12):345-346; Tassone et al., Blood 2004; 104(12):3688-96), CD74 (Stein et al., *ibid.*), CS1 (Tai et al., Blood 2007; Oct 9 (publicación electrónica antes de su impresión) y CD40 (Tai et al., 2005; Cancer Res. 65(13):5898-5906).

Un análisis reciente e integral de antígeno adecuado (*Cluster Designation*, o CD, designación de clúster o grupo) se dirige a las células malignas hematopoyéticas, tal como se muestra por citometría de flujo y que puede ser una guía para seleccionar los anticuerpos adecuados para la inmunoterapia conjugada con el fármaco, es Craig y Foon, Blood, prepublicado en Internet el 15 de enero de 2008; DOL 10.1182/blood-2007-11-120535.

En otra realización preferida, se usan anticuerpos que se internalizan rápidamente y luego se vuelven a expresar, procesar y presentar en las superficies de las células, lo cual permite la captación continua y la acumulación del conjugado circulante por la célula. Un ejemplo de un par anticuerpo/antígeno que se prefiere más que todos es el LL1, un MAb anti-CD74 (cadena invariable, chaperona específica de clase II, li) (véanse, por ejemplo, los documentos de patente de los EE. UU. con los números 6,653,104; 7,312,318). El antígeno CD74 está altamente

expresado en los linfomas de células B (incluso el mieloma múltiple) y las leucemias, ciertos linfomas de células T, melanomas, cánceres colónico, pulmonar y renal, glioblastomas, y ciertos otros cánceres (Ong et al., Immunology 98:296-302 (1999)), así como también, ciertas enfermedades autoinmunitarias. Hay una revisión del uso de los anticuerpos CD74 en el cáncer en Stein et al., Clin Cancer Res. 2007 Sep 15;13(18 Pt 2):5556s-5563s.

- 5 Las enfermedades que se tratan preferiblemente con anticuerpos anti-CD74 incluyen, aunque no de manera taxativa: linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, melanoma, cáncer de pulmón, colon y renal, glioblastoma multiforme, histiocitomas, leucemias mieloides y mieloma múltiple. La expresión continua del antígeno CD74 por cortos periodos en la superficie de las células diana, seguida por la internalización del antígeno y la reexpresión del antígeno, permite que el anticuerpo LL1 direccionador sea internalizado junco con cualquier parte quimioterapéutica que transporte. Esto permite que una alta concentración terapéutica del conjugado LL1-fármaco quimioterapéutico se acumule dentro de las células. Los conjugados internalizados de LL1-fármaco quimioterapéutico forman ciclos a través de los lisosomas y endosomas, y la parte quimioterapéutica se libera en una forma activa dentro de las células diana.

Dock-and-Lock (DNL, acople seguro)

- 15 En ciertas realizaciones preferidas, los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos pueden producirse usando la tecnología *dock-and-lock* (véanse, por ejemplo, los documentos de patente de los EE. UU. con los números 7.521.056; 7.550.143; 7.534.866; 7.527.787 y la solicitud de patente de los EE. UU. No. 11/925.408). El método DNL aprovecha las interacciones específicas proteína/proteína que tienen lugar entre las subunidades regulatorias (R) de la cinasa de la proteína dependiente de (PKA, *cAMP-dependent protein kinase*) y el dominio de anclaje (AD, *anchoring domain*) de las proteínas de anclaje de la A-cinasa (AKAP, *A-kinase anchoring proteins*) (Baillie et al., FEBS Letters. 2005; 579: 3264. Wong y Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959). La PKA, que desempeña un rol central en una de las mejores estudiadas vías de transducción de señales, disparada por la unión de la segunda cAMP mensajera a las subunidades R, se aisló por primera vez del músculo de esqueleto del conejo en 1968 (Walsh et al., J. Biol. Chem. 1968;243:3763). La estructura de la holoenzima consiste en dos subunidades catalíticas que se mantienen en una forma inactiva por las subunidades R (Tailor, J. Biol. Chem. 1989;264:8443). Las isozimas de la PKA se encuentran con dos tipos de subunidades R (RI y RII), y cada tipo tiene las isoformas α y β (Scott, Pharmacol. Ther. 1991;50:123). Las subunidades R se han aislado solo como dímeros estables, y se ha demostrado que el dominio de dimerización consiste en los primeros 44 residuos de terminal amino (Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999; 6:222). La unión de cAMP a las subunidades R conduce a la liberación de subunidades catalíticas activas para un amplio espectro de actividades de cinasa de serina/treonina, que están orientadas hacia los sustratos seleccionados, a través de la compartimentalización de la PKA mediante su acople con las AKAP (Scott et al., J. Biol. Chem. 1990;265:21561)

- Como la primera AKAP, la proteína 2 asociada al microtúbulo, se caracterizó en 1984 (Lohmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1984;81:6723), se han identificado más de 50 AKAP que se localizan a diversos sitios subcelulares, lo cual incluye la membrana plasmática, el citoesqueleto de la actina, el núcleo, las mitocondrias y el retículo endoplasmático, con diversas estructuras en especies que varían desde las levaduras hasta los seres humanos (Wong y Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004;5:959). La AD de las AKAP para PKA es una hélice anfipática de 14-18 residuos (Carr et al., J. Biol. Chem. 1991;266:14188). Las secuencias de aminoácidos de la AD son bastante variadas entre las AKAP individuales, donde las afinidades de unión reportadas para los dímeros RII varían de 2 a 90 nM (Alto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003;100:4445). Lo más interesante es que, las AKAP solo se unen a las subunidades R dimericas. Para el RII α humano, la AD se una a una superficie hidrofóbica formada por los 23 residuos de terminal amino (Colledge y Scott, Trends Cell Biol. 1999; 6:216). Así, el dominio de dimerización y el dominio de unión de la AKAP de la RII α humana se encuentran ambos dentro de la misma secuencia de 44 aminoácidos de terminal N (Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999;6:222; Newlon et al., EMBO J. 2001;20:1651), denominado en este documento, DDD.

- Hemos desarrollado una tecnología de plataforma para utilizar el DDD del RII α humano y la AD de una cierta secuencia de aminoácidos como un par excelente de módulos enlazadores para acoplar dos entidades cualesquiera, denominadas en la presente en este documento como **A** y **B**, en un complejo no covalente, que podría acoplarse además en una estructura liada de manera estable, a través de la introducción de residuos de cisteína tanto en DDD como en AD, en posiciones estratégicas, para facilitar la formación de uniones disulfuro. La metodología general del abordaje "dock-and-lock" es la siguiente. La entidad **A** se construye enlazando una secuencia DDD con un precursor de **A**, lo cual resulta en un primer componente, denominado en adelante en la presente memoria descriptiva como **a**. Dado que la secuencia DDD efectuaría la formación espontánea de un dímero, **A** estaría compuesta entonces por **a**₂. La entidad **B** se construye enlazando una secuencia AD con un precursor de **B**, lo cual da como resultado un segundo componente denominado en adelante en la presente memoria descriptiva como **b**. El motivo dimerico de DDD contenido en **a**₂ creará un sitio de acople para unir la secuencia de AD contenida en **b**, facilitando de esta manera una asociación lista de **a**₂ y **b** para formar un complejo trimérico binario, compuesto por **a**₂**b**. Este evento de unión se torna irreversible con una posterior reacción para asegurar de un modo covalente las dos entidades, mediante puentes disulfuro, lo cual tiene lugar de un modo eficiente basándose en el principio de la concentración local eficaz, porque las interacciones iniciales de unión deberían acercar los grupos tiol reactivos ubicados tanto en DDD como AD (Chimura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001;98:8480) para que se ligen específicamente de acuerdo con el sitio.

Al unir DDD y AD alejados de los grupos funcionales de los dos precursores, también es de esperar que tales ligaduras específicas del sitio conserven las actividades originales de los dos precursores. Este abordaje es modular en la naturaleza y potencialmente puede aplicarse para enlazar, específicamente según el sitio y de manera covalente, una amplia variedad de sustancias, incluso los péptidos, las proteínas, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y otras partes efectoras con una amplia variedad de actividades. Utilizando el método de proteínas de fusión para construir efectores conjugados de AD y DDD, virtualmente cualquier proteína o péptido puede incorporarse en un constructo DNL. Sin embargo, la técnica no es limitativa y es posible utilizar otros métodos de conjugación.

Se conoce una variedad de métodos para fabricar proteínas de fusión, incluso la síntesis de ácido nucleico, la hibridación y/o la amplificación para producir un ácido nucleico bicatenario sintético, que codifica una proteína de fusión de interés. Dichos ácidos nucleicos bicatenarios pueden insertarse en vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión por técnicas estándar de biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, a laboratory manual, 2.ª Ed, 1989). En tales realizaciones preferidas, la parte AD y/o DDD puede unirse ya sea al extremo de terminal N o terminal C de una proteína o de un péptido efector, tales como un anticuerpo o fragmento. Sin embargo, el experto advertirá que el sitio de unión de una parte AD o DDD a una parte efectora puede variar, dependiendo de la naturaleza química de la parte efectora y la o las porciones de la parte efectora involucradas en su actividad fisiológica. La unión específica del sitio de un una variedad de partes efectoras puede llevarse a cabo usando técnicas conocidas en este campo, tales como el uso de reactivos de entrecruzamiento bivalentes y/o otras técnicas de conjugación químicas.

En una realización preferida, las proteínas de fusión se ensamblan mediante las técnicas *dock and lock* (DNL) que se explican, por ejemplo, en Rossi EA, et al., Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:6841-6846; en los documentos de patente de los EE. UU. con los números 7.521.056; 7.550.143; 7.534.866; 7.527.787 y en la solicitud de patente de los EE. UU. No. 11/925.408. Las secuencias ejemplares de DDD y AD que se pueden utilizar en el método DNL para formar complejos sintéticos se describen a continuación.

DDD1

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (ID. DE SEC. N.º: 1)

DDD2

CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (ID. DE SEC. N.º: 2)

AD1

QIEILAKQIVDNAIQQA (ID. DE SEC. N.º: 3)

AD2

CGQIEILAKQIVDNAIQQAGC (ID. DE SEC. N.º: 4)

Variantes de secuencia de DNL

0125] En realizaciones alternativas, las variantes de secuencias de las partes AD y/o DDD pueden utilizarse en la construcción de los complejos DNL. Las relaciones estructura-función de los dominios AD y DDD han sido tema de investigación. (Véase, por ejemplo, Burns-Hamuro et al., 2005, Protein Sci 14:2982-92; Carr et al., 2001, J Biol Chem 276:17332-38; Alto et al., 2003, Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50; Hundsrucker et al., 2006, Biochem J 396:297-306; Stokka et al., 2006, Biochem J 400:493-99; Gold et al., 2006, Mol Cell 24:383-95; Kinderman et al., 2006, Mol Cell 24:397-408.)

Por ejemplo, Kinderman et al. (2006) examinaron la estructura cristalina de la interacción de unión de AD-DDD y llegaron a la conclusión de que la secuencia DDD humana contenía una serie de residuos de aminoácidos conservados que eran importantes ya sea en la formación del dímero o en la unión de AKAP, subrayado en la ID. DE SEC. N.º: 1 presentada más abajo. (Véase la figura 1 de Kinderman et al., 2006.) El experto advertirá que al designar las variantes de secuencias de la secuencia de DDD, uno evitaría convenientemente cambiar cualquiera de los residuos subrayados, en tanto que podrían hacerse sustituciones de aminoácidos conservadores para los residuos que son menos críticos para la dimerización y la unión de AKAP.

Secuencia de DDD humana a partir de la cinasa A de la proteína

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (ID. DE SEC. N.º: 1)

Alto et al. (2003) llevaron a cabo un análisis bioinformático de la secuencia AD de diversas proteínas AKAP ara diseñar una secuencia AD selectiva de RII llamada AKAP-IS (ID. DE SEC. N.º: 5), con una constante de unión para DDD de 0,4 nM. La secuencia AKAPIS se diseñó como un antagonista peptídico de AKAP que se une a PKA. Los residuos en la secuencia AKAP-IS donde las sustituciones tendían a reducir la unión a DDD están subrayados en la ID. DE SEC. N.º: 3.

SECUENCIA AKAP-IS

QIEILAKQIVDNAIQQA (ID. DE SEC. N.º: 3)

De manera similar, Gold (2006) utilizó cristalografía y tamizado de péptidos para desarrollar una secuencia SuperAKAP-IS (ID. DE SEC. N.º: 5), que exhibe una selectividad que es cinco órdenes de magnitud mayor para la isoforma de RII de PKA, en comparación con la isoforma de RI. Los residuos subrayados indican las posiciones de las sustituciones de los aminoácidos, con relación a la secuencia de AKAP-IS, que aumentaron la unión a la parte DDD de RII α . En esta secuencia, el residuo Q de terminal N está numerado como el número de residuo 4 y un residuo de terminal Cu es un residuo número 20. Los residuos en los que podrían hacerse sustituciones para afectar la afinidad para RII α fueron los residuos 8, 11, 15, 16, 18, 19 y 20 (Gold et al., 2006). Se contempla que en ciertas realizaciones alternativas, la secuencia SuperAKAP-IS puede estar sustituida para la secuencia de la parte AD de AKAP-IS a fin de preparar los constructos de DNL. Otras secuencias alternativas que podrían sustituirse para la secuencia AD de AKAP-IS se muestran en las ID. DE SEC. N.º: 6-8. Las sustituciones relativas a la secuencia AKAP-IS se han subrayado. Se prevé que, al igual que con la secuencia AKAP-IS (ID. DE SEC. N.º: 3), la parte de AD también puede incluir los residuos cisteína y glicina adicionales con terminal N y los residuos glicina y cisteína con terminal C, como se muestra en la ID. DE SEC. N.º: 4.

SuperAKAP-IS

QIEYVAKQIVDYAIHQQA (ID. DE SEC. N.º: 5)

Secuencias de AKAP alternativas

QIEYKAKQIVDHAHQQA (ID. DE SEC. N.º: 6)

20 QIEYHAKQIVDHAHQQA (ID. DE SEC. N.º: 7)

QIEYVAKQIVDHAHQQA (ID. DE SEC. N.º: 8)

Stokka et al. (2006) también desarrollaron competidores peptídicos de la unión de AKAP a PKA, lo cual se muestra en la ID. DE SEC. N.º: 9-11. Los antagonistas peptídicos se designaron como Ht31 (ID. DE SEC. N.º: 9), RIAD (ID. DE SEC. N.º: 10) y PV-38 (ID. DE SEC. N.º: 11). El péptido Ht-31 exhibió una mayor afinidad para la isoforma RII de PKA, en tanto que RIAD y PV-38 demostraron una mayor afinidad para RI.

Ht31

DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (ID. DE SEC. N.º: 9)

RIAD

LEQYANQLADQIIKEATE (ID. DE SEC. N.º: 10)

30 *PV-38*

FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (ID. DE SEC. N.º: 11)

Hundsrucker et al. (2006) desarrollaron otros competidores peptídicos más para la unión de AKAP a PKA, con una constante de unión tan baja como de 0.4 nM a DDD de la forma RII de PKA. Las secuencias de diversos péptidos antagonísticos de AKAP se proveen en la tabla 1 de Hundsrucker et al. Los residuos que estaban altamente conservados entre los dominios de AD de diferentes proteínas de AKAP se indican abajo subrayados, con referencia a la secuencia AKAP IS. Los residuos son los mismos que los observados por Alto et al. (2003), con la adición del residuo de alanina de terminal C. (Véase la figura 4 de Hundsrucker et al. (2006)). Las secuencias de antagonistas de péptidos con afinidades particularmente altas para la secuencia de DDD de RII se muestra en la ID. DE SEC. N.º: 12-14.

40 *AKAP-IS*

QIEILAKQIVDNAIQQA (ID. DE SEC. N.º: 3)

AKAP7 δ -wt-pep

PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (ID. DE SEC. N.º: 12)

AKAP7 δ -L304T-pep

45 PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (ID. DE SEC. N.º: 13)

AKAP7 δ -L308D-pep

PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY (ID. DE SEC. N.º: 14)

5 Carr et al. (2001) examinaron el grado de homología de secuencia entre diferentes secuencias de DDD de unión a AKAP provenientes de proteínas humanas y no humanas e identificaron los residuos en las secuencias de DDD que parecieron ser las más altamente conservadas entre las diferentes partes de DDD. Estas se indican a continuación, subrayadas, con referencia a la secuencia de DDD de RII α de PKA humana de la ID. DE SEC. N.º: 1. Los residuos que estaban particularmente conservados se indican en cursiva. Los residuos se superponen con los sugeridos por Kinderman et al. (2006) pero no son idénticos a ellos, para que sean importantes para unirse a las proteínas de AKAP.

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (ID. DE SEC. N.º: 1)

10 El experto advertirá en general, que aquellos residuos de aminoácidos que son altamente conservados en las secuencias DDD y AD de las diferentes proteínas son los que pueden preferirse que permanezcan constantes para hacer las sustituciones de aminoácidos, en tanto que los residuos que son menos altamente conservados pueden ser más proclives de variaciones para producir variantes de secuencias de las secuencias AD y/o DDD que se describen en el presente documento.

15 Sustituciones de aminoácidos

En realizaciones alternativas, los métodos y las composiciones descritos pueden involucrar la producción y el uso de proteínas o péptidos con uno o más residuos de aminoácidos sustituidos. Por ejemplo, las secuencias DDD y/o AD empleadas para hacer los constructos DNL pueden modificarse como se describió anteriormente.

20 El experto será consciente de que, en general, las sustituciones de aminoácidos típicamente implican el reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido de propiedades relativamente similares (es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos). Las propiedades de los diversos aminoácidos y el efecto de la sustitución de los aminoácidos en la estructura y función de la proteína han sido objeto de un exhaustivo estudio y conocimiento en la técnica.

25 Por ejemplo, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos (Kyte & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157:105-132). El carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez, define la interacción de la proteína con otras moléculas. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático, basándose en su hidrofobicidad y en las características de carga (Kyte & Doolittle, 1982), estos son: isoleucina (+4,5); valine (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/istina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Al hacer las sustituciones conservadoras, se prefiere el uso de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , se prefiere más si está dentro de ± 1 , y más todavía si está dentro de $\pm 0,5$.

35 La sustitución de aminoácidos también puede tomar en cuenta la hidrofiliidad del residuo del aminoácido (por ejemplo, documento de patente de los EE, UU, con el número 4.554.101). Se han asignado valores de hidrofiliidad a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0); glutamato (+3,0); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5, +,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valine (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se prefiere el reemplazo de aminoácidos con otros de similar hidrofiliidad.

40 Otras consideraciones incluyen el tamaño de la cadena lateral del aminoácido. Por ejemplo, por lo general, no sería preferible reemplazar un aminoácido con una cadena lateral compacta, tales como la glicina o la serina, con un aminoácido con una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, un triptófano o una tirosina. El efecto de diversos residuos de aminoácidos sobre la estructura secundaria de la proteína es también un tema de consideración. Mediante el estudio empírico, se ha determinado el efecto de diferentes residuos de aminoácidos sobre la tendencia de los dominios de la proteína para adoptar una estructura secundaria alfa-helicoidal, de lámina beta o de giro inverso y es conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Chou & Fasman, 1974, Biochemistry, 13:222-245; 1978, Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276; 1979, Biophys. J., 26:367-384).

45 Basándose en tales consideraciones y en estudios empíricos exhaustivos, se han construido tablas de sustituciones conservadoras de aminoácidos y son conocidas en la técnica. Por ejemplo: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. De manera alternativa: Ala (A) leu, ile, val; Arg (R) gln, asn, lys; Asn (N) his, asp, lys, arg, gln; Asp (D) asn, glu; Cys (C) ala, ser; Gln (Q) glu, asn; Glu (E) gln, asp; Gly (G) ala; His (H) asn, gln, lys, arg; Ile (I) val, met, ala, phe, leu; Leu (L) val, met, ala, phe, ile; Lys (K) gln, asn, arg; Met (M) phe, ile, leu; Phe (F) leu, val, ile, ala, tyr; Pro (P) ala; Ser (S), thr; Thr (T) ser; Trp (W) phe, tyr; Tyr (Y) trp, phe, thr, ser; Val (V) ile, leu, met, phe, ala.

55 Otras consideraciones para las sustituciones de aminoácidos incluyen si el residuo está o no ubicado en el interior de una proteína o si está expuesto al disolvente. Para los residuos interiores, las sustituciones conservadoras incluirían: Asp y Asn; Ser y Thr; Ser y Ala; Thr y Ala; Ala y Gly; Ile y Val; Val y Leu; Leu y Ile; Leu y Met; Phe y Tyr; Tyr y Trp. (Véase, por ejemplo, el sitio web de PROWL en rockefeller.edu) Para los residuos expuestos al disolvente,

las sustituciones conservadoras incluirían: Asp y Asn; Asp y Glu; Glu y Gln; Glu y Ala; Gly y Asn; Ala y Pro; Ala y Gly; Ala y Ser; Ala y Lys; Ser y Thr; Lys y Arg; Val y Leu; Leu y Ile; Ile y Val; Phe y Tyr. (Id.) Se han construido diversas matrices para facilitar la selección de las sustituciones de aminoácidos, tales como la matriz de puntuación de PAM250, la matriz Dayhoff, la matriz Grantham, la matriz McLachlan, la matriz Doolittle, la matriz Henikoff, la matriz Miyata, la matriz Fitch, la matriz Jones, la matriz Rao, la matriz Levin y la matriz Risler (*Idem.*)

Al determinar las sustituciones de aminoácidos, uno también puede considerar la existencia de uniones intermoleculares o intramoleculares, tales como la formación de uniones iónicas (puentes de sal) entre los residuos cargados positivamente (por ejemplo, His, Arg, Lys) y los residuos cargados negativamente (por ejemplo, Asp, Glu) o las uniones de disulfuro entre los residuos de cisteína cercanos.

Los métodos para sustituir cualquier aminoácido por otro aminoácido cualquiera en una secuencia de proteínas codificadas son ampliamente conocidos y una cuestión de experimentación de rutina para el experto, por ejemplo, mediante la técnica de mutagénesis dirigida al sitio o por síntesis y ensamblaje de oligonucleótidos que codifican una sustitución de aminoácido y empalme en un constructo del vector de expresión.

Avímeros

En ciertas realizaciones, las partes de unión aquí descritas pueden comprender una o más secuencias de avímeros. Los avímeros son una clase de proteínas de unión un tanto similares a los anticuerpos en sus afinidades y especificidades para diversas moléculas diana. Fueron desarrolladas a partir de dominios del receptor extracelular humano por mezcla [shuffling] de exones *in vitro* y exhibición de fagos. (Silverman et al., 2005, Nat. Biotechnol. 23:1493-94; Silverman et al., 2006, Nat. Biotechnol. 24:220). Las proteínas multidominio resultantes pueden comprender múltiples dominios de unión independientes, que pueden denotar una mejor afinidad (en ciertos casos sub-nanomolar) y especificidad en comparación con las proteínas de unión de un solo epítipo. (*Id.*) En varias realizaciones, los avímeros pueden estar unidos, por ejemplo, a las secuencias DDD y/o AD para usar en los métodos y las composiciones reivindicados. Detalles adicionales referidos a los métodos de construcción y al uso de avímeros se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitudes de patente de los EE. UU. con los números 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 y 20050221384.

Exhibición de fagos

Ciertas realizaciones de las composiciones y/o los métodos reivindicados pueden referirse a péptidos de unión y/o miméticos peptídicos de diversas moléculas diana, células o tejidos. Los péptidos de unión pueden identificarse por cualquier método conocido en esta área, incluso, aunque no taxativamente, la técnica de exhibición de fagos. Varios métodos de exhibición de fagos y técnicas para producir las diversas poblaciones de péptidos son ampliamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las patentes de los EE. UU. con los números 5.223.409; 5.622.699 y 6.068.829 describen métodos para preparar una biblioteca de fagos. La técnica de exhibición de fagos implica manipular genéticamente los bacteriófagos, de manera que los pequeños péptidos puedan expresarse en su superficie (Smith y Scott, 1985, Science 228:1315-1317; Smith y Scott, 1993, Meth. Enzymol. 21:228-257). Además de los péptidos, también se pueden exhibir dominios de proteínas mayores, tales como anticuerpos de cadena simple exhibidos en la superficie de las partículas de los fagos (Arap et al., 1998, Science 279:377-380).

Las secuencias de aminoácidos direccionadoras selectivas para un órgano, tejido, tipo de célula o molécula diana dados pueden aislarse por *panning* [paneo o panoramización] (Pasqualini y Ruoslahti, 1996, Nature 380:364-366; Pasqualini, 1999, The Quart. J.Nucl. Med. 43:159-162). En pocas palabras, una biblioteca de fagos que contienen péptidos direccionadores putativos se administra a un organismo intacto o a órganos, tejidos, tipos de células o moléculas dianas aislados y se recogen muestras que contienen fagos unidos. Los fagos que se unen a un objetivo se pueden eluir de un órgano diana, tejido, tipo de célula o molécula diana y luego amplificarse cultivándolos en las bacterias hospedadoras.

En ciertas realizaciones, el fago puede propagarse en las bacterias hospedadoras entre las rondas del *panning*. En lugar de lisarse por el fago, las bacterias pueden segregar en cambio múltiples copias de fago que denotan un inserto particular. Si se desea, el fago amplificado puede exponerse a los órganos diana, tejidos, tipo de células o molécula diana una vez más y recogerse para rondas adicionales de *panning*. Las múltiples rondas de *panning* pueden llevarse a cabo hasta que se obtenga una población de ligantes selectivos o específicos. La secuencia de aminoácido de los péptidos puede determinarse por secuenciamiento del AND correspondiente al inserto peptídico direccionador en el genoma de los fagos. El péptido direccionador identificado luego se puede producir como un péptido sintético por técnicas de química de proteínas estándar (Arap et al., 1998, Smith et al., 1985).

En ciertas realizaciones, es posible usar un protocolo de sustracción para reducir aún más el la unión de los fagos de fondo. El propósito de la sustracción es el de remover el fago de la biblioteca que se une a dianas distintas de aquella de interés. En realizaciones alternativas, la biblioteca de fagos puede preseleccionarse contra una célula, un tejido o un órgano de control. Por ejemplo, los péptidos que se unen al tumor se pueden identificar tras preseleccionar una biblioteca contra una línea de células normales de control. Tras la sustracción, la biblioteca puede seleccionarse contra la molécula, la célula, el tejido o el órgano de interés. Otros métodos de protocolos de sustracción son conocidos y pueden usarse en la práctica de los métodos reivindicados, por ejemplo, según se

describe en los documentos de patente de los EE. UU. con los números 5.840.841, 5.705.610, 5.670.312 y 5.492.807.

Aptámeros

- 5 En ciertas realizaciones, una parte direccionadora para usar puede ser un aptámero. Los métodos para construir y determinar las características de unión de los aptámeros son ampliamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, tales técnicas se describen en los documentos de patente de los EE. UU. con los números 5.582.981, 5.595.877 y 5.637.459. Los métodos para la preparación y selección de aptámeros que se unen a los objetivos particulares de interés son ampliamente conocidos, por ejemplo, por el documento de patente de los EE. UU. con el número 5.475.096 y el documento de patente de los EE. UU. con el número 5.270.163.
- 10 Los aptámeros pueden prepararse por cualquier método conocido, incluso por métodos sintéticos, recombinantes y de purificación, y se pueden usar solos o en combinación con otros ligandos específicos para el mismo objetivo. En general, hace falta un mínimo de aproximadamente 3 nucleótidos, preferiblemente, de al menos 5 nucleótidos, para efectuar la unión específica. Los aptámeros de secuencias más cortas que 10 bases pueden ser viables, pese a que los aptámeros de 10, 20, 30 o 40 nucleótidos pueden resultar preferidos.
- 15 Los aptámeros pueden aislarse, secuenciarse y/o amplificarse o sintetizarse como moléculas de ADN y ARN convencionales. De manera alternativa, los aptámeros de interés pueden comprender oligómeros modificados. Cualquiera de los grupos hidroxilo comúnmente presentes en los aptámeros puede ser reemplazado por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por un grupo protector estándar o activados para preparar enlaces adicionales a otros nucleótidos, o se pueden conjugar a soportes sólidos. Uno o más enlaces de fosfodiéster se pueden
- 20 reemplazar por grupos de enlace alternativos, tales como P(O)O reemplazado por P(O)S, P(O)NR₂, P(O)R, P(O)OR', CO, o CNR₂, donde R es H o alquilo (1-20C) y R' es alquilo (1-20C); además, este grupo puede estar unido a nucleótidos adyacentes a través de O o S. No todos los enlaces en un oligómero necesitan ser idénticos.

Protocolos de conjugación

- 25 El protocolo de conjugación preferido se basa en una tiol-maleimida, una tiol-vinilsulfona, una tiol-bromoacetamida o una reacción de tiol-iodoacetamida que son superficiales a un pH neutro o ácido. Esto obvia la necesidad de condiciones de pH más alto para las conjugaciones tales como, por ejemplo, las que se requerirían al usar ésteres activos. Otros detalles de protocolos de conjugación ejemplares se describen a continuación, en la sección de los ejemplos.

Tratamiento terapéutico

- 30 En otro aspecto, la invención se refiere al conjugado de la invención, tal y como se define en las reivindicaciones, para usar en el método para el tratamiento de un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado terapéutico a un sujeto. Las enfermedades que se pueden tratar con los conjugados terapéuticos aquí descritos incluyen, aunque no taxativamente: neoplasias de células B (por ejemplo, linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica usando, por ejemplo LL2 MAb; véase el documento de patente de los EE. UU. con el número 6.183.744), adenocarcinomas de los epitelios del sistema digestivo derivados endodérmicamente,
- 35 cánceres tales como cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico, y otros carcinomas, sarcomas, tumores gliales, leucemias mieloides, etc. En particular, se usan ventajosamente anticuerpos contra un antígeno, por ejemplo, un antígeno oncofetal, producido por o asociado con un tumor sólido maligno o neoplasia hematopoyética, por ejemplo, un tumor gastrointestinal, de pulmón, de mama, de próstata, de ovario, testicular, de cerebro o linfático, un sarcoma o un melanoma. Tales agentes terapéuticos se pueden dar una vez por día o de manera reiterada,
- 40 dependiendo del estado de la enfermedad y de la tolerabilidad del conjugado, y también se pueden usar de manera óptima en combinación con otras modalidades terapéuticas, tales como cirugía, radiación externa, radioinmunoterapia, inmunoterapia, quimioterapia, terapia antisentido, terapia con ARN de interferencia, terapia génica y similares. Cada combinación se adaptará al tipo de tumor, al estadio, a la condición del paciente y a la
- 45 terapia previa, y otros factores considerados por el médico tratante.

Tal y como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (es decir, vertebrados e invertebrados) incluso, aunque no de manera taxativa mamíferos, incluidos los seres humanos. No se pretende limitar el término a una edad o sexo en particular. De esta manera, sujetos adultos y recién nacidos, así como también fetos, de cualquier sexo, quedan contemplados en el término.

- 50 En una realización preferida, los conjugados terapéuticos que comprenden el Mu-9 MAb pueden usarse para tratar cáncer colorrectal, así como también, el cáncer pancreático y de ovario, según se describe en los documentos de patente de los EE. UU. con los números 6.962.702 and 7.387.772. Además, los conjugados terapéuticos que comprenden el PAM4 MAb pueden usarse para tratar el cáncer pancreático, según se describe en los documentos de patente de los EE. UU. con los números 7.238.786 y 7.282.567.
- 55 En otra realización preferida, los conjugados terapéuticos que comprenden el RS7 MAb (que se unen al antígeno epitelial de la glicoproteína-1 [EGP-1]) se pueden usar para tratar carcinomas tales como carcinomas de pulmón, estómago, vejiga urinaria, mama, ovario, útero y próstata, según se describe en el documento de patente de los EE.

UU. con el número 7.238.785.

En otra realización preferida, los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb anti-AFP pueden usarse para tratar el carcinoma hepatocelular, tumores de células germinales, y otros tumores productores de AFP, usando formas humanizadas, quiméricas y de anticuerpos humanos, según se describe en el documento de patente de los EE. UU. con el número 7.300.655.

En otra realización preferida, los conjugados terapéuticos que comprenden anticuerpos anti-tenascina pueden usarse para tratar tumores hematopoyéticos y sólidos, y los conjugados que comprenden anticuerpos contra la tenascina pueden emplearse para tratar tumores sólidos, preferiblemente cánceres de cerebro, como los glioblastomas.

En una realización preferida, los anticuerpos que se emplean en el tratamiento de enfermedades humanas son versiones humanas o humanizadas (CDR-injertadas) de anticuerpos, aunque se pueden usar las versiones murinas y quiméricas de los anticuerpos. Algunas especies de moléculas de IgG como agentes de suministro son las que más se prefieren de todas para minimizar las respuestas inmunitarias. Esto es particularmente importante al considerar la repetición de los tratamientos. Para los humanos, un anticuerpo humano o humanizado de IgG es menos proclive a generar una respuesta inmunitaria anti-IgG por parte de los pacientes. Los anticuerpos tales como hLL1 y hLL2 se internalizan rápidamente después de unirse al antígeno internalizador en las células diana, lo que implica que el fármaco quimioterapéutico que es transportado se internaliza rápidamente en las células. También. Sin embargo, los anticuerpos que tienen menores velocidades de internalización también se pueden usar para efectuar una terapia selectiva.

En otra realización preferida, los conjugados terapéuticos pueden usarse contra los patógenos, dado que los anticuerpos contra los patógenos son conocidos. Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a los marcadores producidos por o asociados con lesiones infecciosas, incluso las infecciones virales, bacterianas, fúngicas y parásitas, por ejemplo, causadas por patógenos tales como bacterias, rickettsia, micoplasma, protozoos, hongos y virus, y antígenos y productos asociados con tales microorganismos se han descrito, entre otras cosas, en Hansen et al., documento de patente de los EE. UU. con el número 3.927.193 y Goldenberg, patentes números: 4.331.647, 4.348.376, 4.361.544, 4.468.457, 4.444.744, 4.818.709 y 4.624.846 y en Reichert y Dewitz, antes citados. En una realización preferida, los patógenos se seleccionan del grupo que consiste en virus del VIH, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemophilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, virus de la rabia, virus de la influenza, citomegalovirus, virus del herpes simple del tipo 1, virus del herpes simple del tipo 2, virus seudoparvo sérico humano, virus sincitial respiratorio, virus de varicela-zóster, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus del sarampión, adenovirus, virus de la leucemia de células T humana, virus Epstein-Barr, virus de la leucemia murina, virus de la parotiditis, virus de la estomatitis vesicular, virus de sindbis, virus de coriomeningitis linfocítica, virus de la verruga, virus de la lengua azul, virus Sendai, virus de la leucemia felina, reovirus, virus de la polio, virus 40 del simio, virus del tumor mamario del ratón, virus del dengue, virus de la rubéola, virus del Nilo Occidental, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Babesia bovis*, *Elmeria tenella*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania tropica*, *Trichinella spiralis*, *Theileria parva*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti*, *Mycoplasma arthritidis*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. salivarium* y *pneumoniae*, según se describe in documento de patente de los EE. UU. con el número 6.440.416.

En una realización más preferida, los conjugados farmacológicos de la presente invención que comprenden el anticuerpo anti-gp120 y otros anticuerpos anti-VIH de esta naturaleza pueden usarse como terapéuticos para el VIH en pacientes con SIDA; y los conjugados farmacológicos de anticuerpos contra el *Mycobacterium tuberculosis* son adecuados como terapéuticos para la tuberculosis refractaria a los fármacos. Las proteínas de fusión del MAb anti-gp120 (MAb anti-VIH) y una toxina, tales como la exotoxina *Pseudomonas*, se han examinado para determinar las propiedades antivirales (Van Oigen et al., J Drug Target, 5:75-91, 1998). Los intentos por tratar la infección por VIH en pacientes con SIDA fracasaron, posiblemente debido a la eficacia insuficiente o a la toxicidad inaceptable del hospedador. Los conjugados farmacológicos de la presente invención carecen ventajosamente de estos efectos colaterales tóxicos de las toxinas de la proteína, y por ende, se usan ventajosamente en el tratamiento de la infección por VIH en pacientes con SIDA. Estos conjugados farmacológicos pueden darse solos o en combinación con otros antibióticos o agentes terapéuticos que son efectivos en tales pacientes cuando se administran solos. Los anticuerpos anti-VIH candidatos incluyen el anticuerpo anti-envuelta descrito por Johansson et al. (AIDS. 2006 Oct 3;20(15):1911-5), así como también los anticuerpos anti-VIH descritos y vendidos por Polimun (Viena, Austria), también descritos en la patente de los EE. UU. con el número 5.831.034, la patente de los EE. UU. con el número 5.911.989, y Vcelar et al., AIDS 2007; 21(16):2161-2170 y Joos et al., Antimicrob. Agens Chemother. 2006; 50(5):1773-9. Un agente direccionador preferido para el VIH consiste en varias combinaciones de estos anticuerpos para superar la resistencia.

En otra realización preferida, las enfermedades que se pueden tratar usando los conjugados terapéuticos de las

realizaciones preferidas de la presente invención incluyen, aunque no taxativamente, enfermedad de desregulación inmunitaria y las enfermedades autoinmunitarias relacionadas, incluso las enfermedades autoinmunitarias de clase III, tales como trombocitopenias inmunomediadas, tales como la púrpura trombocitopénica idiopática aguda y la púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, corea de Sydenham, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndrome poliglandular, penfigoide ampoloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nodosa, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía de IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangeítis obliterans, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, escleroderma, hepatitis activa crónica, artritis reumatoide, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva y alveolitis fibrosante, y también diabetes juvenil, según se describe en la serie de solicitudes de patentes provisionarias de los EE. UU. con el número 60/360.259, presentada el 1 de marzo de 2002 (ya vencida). Los anticuerpos típicos de utilidad en estas enfermedades incluyen, aunque no de manera taxativa, los reactivos con antígenos HLA-DR, antígenos de células B y células plasmáticas (por ejemplo, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD74, CD80, CD126, CD138, B7, MUC1, Ia, HM1.24, y HLA-DR), IL-6, IL-17. Dado que muchas de estas enfermedades autoinmunitarias se ven afectadas por los autoanticuerpos producidos por poblaciones de células B aberrantes, la eliminación de estas células B por los conjugados terapéuticos que involucran estos conjugados de anticuerpos-agente terapéutico aquí descritos es un método preferido de la terapia para las enfermedades autoinmunitarias, especialmente cuando se combinan los anticuerpos de células B, en ciertas circunstancias, con los anticuerpos HLA-DR y/o los anticuerpos de células T (incluso aquellos que se dirigen a IL-2 como un antígeno, tales como el anticuerpo anti-TAC). En una realización preferida, el anticuerpo anti-célula B, anti-célula T o antimacrófago u otros anticuerpos de esta naturaleza para usar en el tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunitarias también se puede conjugar para obtener terapéuticos más efectivos para controlar las respuestas del hospedador involucradas en dichas enfermedades autoinmunitarias, y pueden darse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como inhibidores de TNF o anticuerpos de TNF, anticuerpos de células B o T no conjugados, y similares.

En una realización preferida, una incorporación más efectiva en las células y patógenos puede lograrse al usar anticuerpos multivalentes, multiespecíficos o multivalentes, monoespecíficos. Los ejemplos de estos anticuerpos bivalentes y biespecíficos se encuentran en los documentos de patente de los EE. UU. con los números 7.387.772; 7.300.655; 7.238.785; y 7.282.567. Estos anticuerpos multivalentes o multiespecíficos se prefieren particularmente para dirigirse al cáncer y a los organismos infecciosos (patógenos), que expresan múltiples dianas de antígeno e incluso múltiples epítopos de la misma diana de antígeno, pero que a menudo evaden el direccionamiento del anticuerpo y la unión suficiente para la inmunoterapia debido a la expresión o a la disponibilidad insuficiente de una única diana del antígeno en la célula o patógeno. Al dirigirse a múltiples antígenos o epítopos, dichos anticuerpos muestran una mayor unión y tiempo de residencia en el objetivo, proporcionando así una mayor saturación con el fármaco que se está dirigiendo en esta invención.

En otra realización preferida, un agente terapéutico usado en combinación con el conjugado de camptotecina de esta invención puede comprender uno o más isótopos. Los isótopos radioactivos de utilidad para tratar el tejido enfermo incluyen, aunque no de manera taxativa: ^{111}In , ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , y ^{211}Pb . El radionúclido terapéutico preferiblemente tiene una energía de desintegración en el intervalo de 20 a 6000 keV, preferiblemente en los intervalos de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2500 keV para un emisor beta, y 4000-6000 keV para un emisor alfa. Las máximas energías de desintegración de utilidad en los núclidos emisores de partícula beta son, preferiblemente, de 20-5000 keV, más preferiblemente de 100-4000 keV y lo más preferiblemente, de 500-2500 keV. También son preferidos los radionúclidos que sustancialmente se desintegran con partículas emisoras de Auger. Por ejemplo, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sub-119, I125, Ho-161, Os-189m y Ir-192. Las energías de desintegración de los núclidos emisores de partículas beta son, preferiblemente, <1000 keV, más preferiblemente <100 keV y, lo más preferiblemente <70 keV. También se prefieren los radionúclidos que sustancialmente se desintegran con la generación de partículas alfa. Tales radionúclidos incluyen, aunque no de manera taxativa: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 y Fm-255. Las energías de desintegración de los radionúclidos emisores de partículas alfa de utilidad son preferiblemente de 2000-10.000 keV, más preferiblemente, de 3000-8000 keV y, lo más preferiblemente, de 4000-7000 keV. Los radioisótopos potenciales adicionales para usar incluyen ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , ^{113}mIn , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb y similares.

Los radionúclidos y otros metales pueden suministrarse, por ejemplo, usando grupos quelantes unidos a un anticuerpo o conjugado. Los quelatos macrocíclicos tales como NOTA, DOTA, y TETA son para usar con varios metales y radiometales, lo más particularmente, con radionúclidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Tales complejos de metal-quelato pueden prepararse de manera muy estable diseñando a medida el tamaño del anillo al metal de interés. Otros quelatos del tipo anillo, tales como los poliéteres macrocíclicos para formar el complejo ^{223}Ra ,

pueden usarse.

Los agentes terapéuticos para usar en la combinación con los conjugados de camptotecina que se describen aquí también incluyen, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos tales como vinca alcaloides, antraciclinas, epidofilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de Cox-2, antimetabólicos, agentes antiangiogénicos y proapoptóticos, particularmente doxorubicina, metotrexato, taxol, otras camptotecinas, y otras de estas clases y de otras clases de agentes anticancerígenos y similares. Otros fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen mostazas de nitrógeno, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejos de coordinación de platino, hormonas y similares. Los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en GOODMAN y GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (Mac-Millan Publishing Co. 1985), así como también, las ediciones revisadas de estas publicaciones. Otros agentes quimioterapéuticos adecuados, tales como los fármacos experimentales, con conocidos para los expertos en la técnica.

Los fármacos ejemplares de uso incluyen, aunque no de manera taxativa, 5-fluorouracilo, apidina, azaribina, anastrozol, antraciclinas, bendamustina, bleomicina, bortezomib, briostatina-1, busulfan, caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, 10-hidroxicamptotecina, carmustina, celebrex, clorambucil, cisplatino (CDDP), inhibidores de Cox-2, irinotecán (CPT-11), SN38, carboplatino, cladribina, camptotecinas, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, docetaxel, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina (2P-DOX), cianomorfolino doxorubicina, doxorubicina glucurónido, epirubicina glucurónido, estramustina, epidofilotoxina, agentes de unión del receptor de estrógenos, etopósido (VP16), etopósido glucurónido, etopósido fosfato, floxuridina (FUdR), 3',5'-O-dioleoil-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, inhibidores de farnesil-transferasa proteica, gemcitabina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, L-asparaginasa, lenolidamida, leucovorina, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramina, mitomicina, mitotano, navelbina, nitrosourea, plicomicina, procarbazona, paclitaxel, pentostatina, PSI-341, raloxifeno, semustina, estreptozocina, tamoxifeno, taxol, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecán, mostaza de uracilo, vinorelbina, vinblastina, vincristina y alcaloides de la vinca. Estos agentes pueden ser parte de los conjugados descritos en la presente memoria descriptiva o, de manera alternativa, pueden administrarse en combinación con los conjugados descritos, ya sea antes o después de la administración del conjugado o en simultáneo con ella. De manera alternativa, uno o más anticuerpos desnudos terapéuticos tales como los que son conocidos en la técnica pueden usarse en combinación con los conjugados descritos. Los anticuerpos desnudos terapéuticos ejemplares se describen en la sección precedente.

Los agentes terapéuticos que pueden emplearse en conjunto con los conjugados de camptotecina también pueden comprender toxinas conjugadas con partes direccionadoras. Las toxinas que pueden emplearse en este aspecto incluyen: ricina, abrina, ribonucleasa (RNase, *ribonuclease*), DNase I, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antiviral de pokeberry [*Phytolacca americana*], gelonina, toxina difterina, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*. (Véase, por ejemplo, Pastan, et al., Cell (1986), 47:641, y Sharkey y Goldenberg, CA Cancer J Clin. 2006 Jul-Aug;56(4):226-43.) Otras toxinas adecuadas para usar en la presente son conocidas para los expertos en la técnica y se describen en el documento de patente de los EE. UU. con el número U.S. 6.077.499.

Otra clase más de agente terapéutico puede comprender uno o más inmunomoduladores. Los inmunomoduladores de uso pueden seleccionarse entre citocinas, un factor de crecimiento de células madre, una linfotóxina, un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF, *colony stimulating factor*), un interferón (IFN), eritropoyetina, trombopoyetina y una combinación de ellos. Específicamente útiles son las linfotoxinas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), los factores hematopoyéticos, tales como la interleucina (IL), el factor estimulante de colonias, tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*) o factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF, *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*), interferón, tales como interferones- α , - β o - γ , y factor de crecimiento de células madre, tales como las designadas como "factor S1". Entre las citocinas se incluyen las hormonas de crecimiento, tales como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glucoproteínas, tales como hormona folículoestimulante (FSH, *follicle stimulating hormone*), hormona tiroidea estimulante (TSH, *thyroid stimulating hormone*), y hormona luteinizante (LH, *luteinizing hormone*); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor de necrosis tumoral- α y - β ; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado con la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformadores (TGF, *transforming growth factors*), tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento del tipo insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones, tales como interferón- α , - β , y - γ ; factor estimulante de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (MCSF); interleucinas (IL), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, kit-ligando o FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, factor de necrosis tumoral y LT. Tal y como se usa en la presente, el término citocinas incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencias nativas.

Las quimiocinas de uso incluyen RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-Beta y IP-10.

Formulación y administración

5 Las vías adecuadas de administración de los conjugados incluyen, sin limitación, las siguientes: administración oral, parenteral, rectal, transmucosa, intestinal, inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intravítreas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares. La vía de administración preferida es la parenteral. De manera alternativa, se puede administrar el compuesto de manera local, más que sistémica, por ejemplo, mediante una inyección del compuesto directamente en un tumor sólido.

10 Los inmunoconjugados pueden formularse según los métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por lo cual el inmunoconjugado se combina en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable. La solución salina estéril tamponada con fosfato es un ejemplo de un excipiente farmacéuticamente aceptable. Otros excipientes adecuados son ampliamente conocidos para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSIFICATION FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5.^a Edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18.^a Edición (Mack Publishing Company 1990), y las ediciones actualizadas de los mismos.

15 El inmunoconjugado puede formularse para la vía de administración intravenosa, por ejemplo, inyección por bolo o infusión continua. Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención se infunde durante un período inferior a las 4 horas aproximadamente y, más preferiblemente, durante un lapso menor que unas 3 horas. Por ejemplo, los primeros 25-50 mg podrían infundirse al cabo de 30 minutos, preferiblemente incluso en 15 minutos y el resto, infundirse en las siguientes 2-3 horas. Las formulaciones inyectables pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como ampollas o envases de múltiples dosis, más un conservante. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes para facilitar la formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. De manera alternativa, el principio activo puede venir en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirogénica estéril, antes de usar.

25 Es posible emplear métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de acción del conjugado terapéutico. Las preparaciones de liberación de control se pueden preparar a través del uso de polímeros para formar complejos o adsorber el inmunoconjugado. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli(acetato de etilen-co-vinilo) y matrices de un copolímero de polianhídrido, de dímero de ácido estérico y ácido sebásico. Sherwood et al., Bio/Technology 10: 1446 (1992). La velocidad de liberación de un inmunoconjugado desde dicha matriz depende del peso molecular del inmunoconjugado, de la cantidad de inmunoconjugado dentro de la matriz, y del tamaño de las partículas dispersas. Saltzman et al., Biophys. J. 55: 163 (1989); Sherwood *et al.*, *supra*. Otras formas de dosificación sólidas se describen en Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSIFICATION FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5.^a Edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18.^a Edición (Mack Publishing Company 1990), y sus ediciones actualizadas.

35 Por lo general, la dosificación de un inmunoconjugado administrado para humanos variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la estatura, el sexo, el estado de salud en general del paciente y su historia clínica. Puede ser conveniente administrarle al receptor una dosificación de inmunoconjugado que se ubique en el intervalo de entre aproximadamente 1 mg/kg y 25 mg/kg, como una única infusión intravenosa, pese a que se puede administrar una dosificación menor o mayor también, según las circunstancias del caso. Una dosificación de 1-20 mg/kg para un paciente de 70 kg, por ejemplo, es de 70-1400 mg, o de 41-824 mg/m² para un paciente de 1,7-m. La dosificación puede repetirse según las necesidades, por ejemplo, una vez por semana durante 4-10 semanas, una vez por semana durante 8 semanas, o una vez por semana durante 4 semanas. También se puede administrar con menor frecuencia; por ejemplo, semana por medio durante varios meses o una vez por mes o de manera trimestral durante varios meses, según sea necesario como terapia de mantenimiento.

45 De manera alternativa, se puede administrar un inmunoconjugado como una dosificación cada 2 o 3 semanas, lo cual se repite por un total de al menos 3 dosificaciones. O, dos veces por semana, durante 4-6 semanas. Si la dosificación baja a 200-300 mg/m² aproximadamente (340 mg por dosificación para un paciente de 1,7-m, o 4,9 mg/kg para un paciente de 70 kg), se puede administrar una vez o incluso dos veces por semana durante 4 a 10 semanas. De manera alternativa, el esquema de dosificación puede reducirse, a saber, cada 2 o 3 semanas durante 2-3 meses. Sin embargo, se ha determinado que incluso pueden administrarse dosis mayores, tales como 20 mg/kg una vez por semana o una vez cada 2-3 semanas, mediante una infusión i.v. lenta, durante reiterados ciclos de administración. El esquema posológico, opcionalmente, puede repetirse a otros intervalos y la dosificación puede darse a través de varias vías parenterales, con el ajuste apropiado de la dosis y el esquema.

55 En realizaciones preferidas, los inmunoconjugados son de utilidad para la terapia para combatir el cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen, aunque no de manera taxativa, carcinoma, linfoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma y leucemia, mieloma o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de estos cánceres se indican más abajo e incluyen los siguientes: cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, astrocitomas, cáncer de pulmón incluso el cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer

de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluso cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, carcinoma hepatocelular, tumores neuroendócrinos, cáncer de tiroides medular, carcinoma tiroideo diferenciado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como también cáncer de cabeza y cuello. El término "cáncer" incluye los tumores o células malignas primarios (por ejemplo, aquellos cuyas células no han migrado hacia otros lugares del cuerpo del sujeto que no sea aquel donde se originó la primera neoplasia o tumor) y los tumores o células malignas secundarios (por ejemplo, los que surgen de metástasis, la migración de células malignas o células tumorales a lugares secundarios que no son aquel en el que se creó el tumor original).

Otros ejemplos de cánceres o neoplasias incluyen, aunque no de manera taxativa: leucemia linfoblástica infantil aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cáncer hepatocelular del adulto (primario), cáncer de hígado del adulto (primario), leucemia linfocítica aguda del adulto, leucemia mieloide aguda del adulto, linfoma de Hodgkin del adulto, leucemia linfocítica del adulto, linfoma no Hodgkin del adulto, cáncer de hígado primario del adulto, sarcoma de tejido blando del adulto, linfoma relacionado con el SIDA, neoplasias relacionadas con el SIDA, cáncer anal, astrocitoma, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, glioma del tronco encefálico, tumores de cerebro, cáncer de mama, cáncer de la pelvis renal y del uréter, linfoma del sistema nervioso central (primario), linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral, cáncer cervical, cáncer hepatocelular infantil (primario), cáncer de hígado infantil (primario), leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma del tronco encefálico infantil, astrocitoma cerebelar infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores de células germinales extracranianas infantiles, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin infantil, glioma hipotalámico-del camino visual infantil, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no Hodgkin infantil, tumores neuroectodérmicos primitivos pineales y supratentoriales infantiles, cáncer de hígado primario infantil, rhabdomyosarcoma infantil, sarcoma de tejido blando infantil, glioma del camino visual-hipotalámico infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, carcinoma de células de los islotes pancreáticos endócrino, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing y tumores relacionados, cáncer de páncreas exócrino, tumor de células germinales extracraniales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, cáncer de mama femenino, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores gastrointestinales, tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, leucemia de células capilares, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin, hipergamaglobulinemia, cáncer hipofaríngeo, cánceres intestinales, melanoma intraocular, carcinoma de células de células de islotes, cáncer de las células de islotes pancreáticos, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de labio y de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, trastornos linfoproliferativos, macroglobulinemia, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso primario, oculto y metastásico, cáncer de cuello escamoso primario y metastásico, cáncer de cuello escamoso, metastásico, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de las células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cavidad nasal y cáncer de los senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de cuello escamoso, oculto, primario y metastásico, cáncer orofaríngeo, sarcoma fibroso osteo/maligno, histiocitoma fibroso osteo/maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de huesos, cáncer de ovario epitelial, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de potencial baja malignidad, cáncer pancreático, paraproteinemias, policitemia vera, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor pituitario, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de hígado primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, cáncer renal de pelvis y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcomas sarcoidosis, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago, tumores neuroectodérmicos y pineales supratentoriales primitivos, linfoma de células T, cáncer de testículo, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y del uréter, cáncer transicional de la pelvis renal y del uréter, tumores trofoblásticos, cáncer de células de la pelvis renal y del uréter, cáncer de uretra, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer vaginal, glioma hipotalámico y del camino visual, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de la neoplasia, situado en un sistema orgánico de los enumerados anteriormente.

Los métodos y composiciones que se describen y reivindican en la presente memoria descriptiva se pueden usar para tratar afecciones malignas o premalignas y para evitar el avance hacia un estado neoplásico o maligno, lo cual incluye aunque no de manera taxativa aquellos trastornos antes descritos. Tales usos están indicados en afecciones conocidas o en sospechas de afecciones de un avance precedente hacia una neoplasia o cáncer, en particular, cuando se ha producido un crecimiento celular no neoplásico que consiste en una hiperplasia, metaplasia o lo más particularmente, en una displasia (para una revisión de tales afecciones de crecimientos anormales, véase Robbins y Angell, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79 (1976)).

La displasia con frecuencia es la predecesora del cáncer, y se encuentra principalmente en los epitelios. Es la forma más desordenada del crecimiento celular no neoplásico, lo cual implica una pérdida en la uniformidad de las células

individuales y en la orientación arquitectónica de las células. Lo más característico es que las displasias se produzcan cuando existe una irritación o inflamación crónica. Los trastornos displásicos que se pueden tratar incluyen, aunque no de manera taxativa, displasia ectodérmica anhidrótica, displasia anterofacial, displasia torácica asfíxica, displasia atriodigital, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia cervical, displasia condroectodérmica, displasia cleidocraniana, displasia ectodérmica congénita, displasia craneodiafisaria, displasia cráneo-carpo-tarso, displasia craneometafisaria, displasia de la dentina, displasia diafisaria, displasia ectodérmica, displasia del esmalte, displasia encefalo-oftálmica, displasia epifisaria hemimelia, displasia epifisaria múltiple, displasia epifisaria punctata o punteada, displasia epitelial, displasia facioidigitogenital, displasia fibrosa familiar de las mandíbulas, displasia plagada blanca familiar, displasia fibromuscular, displasia fibrosa de huesos, displasia ósea florida, displasia renal-retinal hereditaria, displasia ectodérmica hidrótica, displasia ectodérmica hipohidrótica, displasia tímica linfopénica, displasia mamaria, displasia mandibulofacial, displasia metafisaria, displasia de Mondini, displasia fibrosa monostótica, displasia mucoepitelial, displasia epifisaria múltiple, displasia oculoauriculovertebral, displasia oculodentodigital, displasia oculovertbral, displasia odontogénica, displasia oftalmomandibulomélica, displasia cemental periapical, displasia fibrosa polioestótica, displasia espondiloepifisaria pseudocondroplásica, displasia retinal, displasia septo-óptica, displasia espondiloepifisaria y displasia ventriculorradiar.

Otros trastornos preneoplásicos que se pueden tratar incluyen, aunque no de manera taxativa, trastornos disproliferativos benignos (por ejemplo, tumores benignos, afecciones fibroquísticas, hipertrofia tisular, pólipos o adenomas intestinales y displasia esofágica), leucoplaquia, queratosis, enfermedad de Bowen, piel de granjero, solar queilitis y queratosis solar.

En las realizaciones preferidas, el método de la invención se usa para inhibir el crecimiento, el avance y/o las metástasis del cáncer, en particular, de los que se mencionaron con anterioridad.

Otras enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas incluyen, aunque no de manera taxativa, el avance y/o las metástasis de las neoplasias y los trastornos relacionados, tales como: leucemia (incluso las leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluso la leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, y tumores sólidos incluidos, aunque no de manera taxativa, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, emangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Kits

Diversas realizaciones pueden referirse a los kits que contienen componentes adecuados para tratar el tejido enfermo en un paciente. Los kits ejemplares pueden contener al menos un anticuerpo conjugado u otra parte direccionadora, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Si la composición que contiene componentes para la administración no está formulada para el suministro mediante el canal alimentario, tales como por administración oral, pueden incluirse un dispositivo capaz de suministrar los componentes del kit mediante algún otro mecanismo. Un tipo de dispositivo, para aplicaciones tales como suministro parenteral, es una jeringa que se usa para inyectar la composición en el organismo de un sujeto. Los dispositivos de Inhalación también se pueden usar.

Los componentes del kit pueden envasarse juntos o por separado, en dos o más recipientes. En ciertas realizaciones, los recipientes pueden ser viales que contengan formulaciones estériles y liofilizadas de una composición adecuada para la reconstitución. Un kit también puede contener uno o más tampones adecuados para la reconstitución y/o dilución de otros reactivos. Otros envases que se pueden usar incluyen, aunque no de manera taxativa, una bolsita, una bandeja, una caja, un tubo o similares. Los componentes del kit pueden envasarse y mantenerse estériles dentro de los recipientes. Otro componente que se puede incluir son las instrucciones de uso para una persona que emplee el kit.

Ejemplos

Se ilustran diversas realizaciones de la presente invención mediante los siguientes ejemplos.

General

Las abreviaturas empleadas son las siguientes [por sus siglas en inglés]: DCC, dicitohexilcarbodiimida; NHS, N-

hidroxisuccinimida, DMAP, 4-dimethylaminopiridina; EEDQ, 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina; MMT, monometoxitritilo; PABOH, alcohol *p*-aminobencílico; PEG, polietilenglicol; SMCC, 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de succinimidilo; TBAF, fluoruro de tetrabutilamonio; TBDMS, cloruro de *tert*-butildimetilsililo.

5 Los cloroformatos de los compuestos hidroxilo en los siguientes ejemplos se prepararon usando trifosgeno y DMAP, según el procedimiento descrito en Moon et al. (J. Medicinal Chem. 51:6916-6926, 2008). Trabajo de extracción se refiere a la extracción con cloroformo, diclorometano o acetato de etilo, y el lavado opcional con bicarbonato saturado, agua y con cloruro de sodio saturado. La cromatografía ultrarrápida se realizó usando gel de sílice de 230-400 mesh y gradiente de metanoldiclorometano, usando hasta 15 % v/v de metanol-diclorometano, salvo que se indique lo contrario. La HPLC de fase inversa se llevó a cabo mediante el método A, usando una columna de HPLC de 7,8 x 300 mm C18, dotada de un filtro precolumna, y usando un gradiente de disolvente de un disolvente A del 100 % hasta un disolvente B del 100 % en 10 minutos, a una velocidad de flujo de 3 ml por minuto y manteniendo en el disolvente B del 100 % a una velocidad de flujo de 4,5 ml por minuto, durante 5 o 10 minutos; o por el método B, usando una columna de 4,6330 mm Xbridge C18, de 2,5 mm, equipada con un filtro precolumna, usando el gradiente del disolvente del 100 % del disolvente A hasta un 100 % del disolvente B, a una velocidad de flujo de 1,5 ml por minuto, durante 4 minutos y 100 % del disolvente B, a una velocidad de flujo de 2 ml por minuto durante 1 minuto. El disolvente A era un acetato de amonio acuoso al 0,3 %, pH 4,46, en tanto que el disolvente B era un acetato de 9:1 acetonitrilo-amonio acuoso (0,3 %), pH 4,46. La HPLC se mantuvo bajo control mediante un detector de absorbancia dual en línea, configurado a 360 nm y 254 nm.

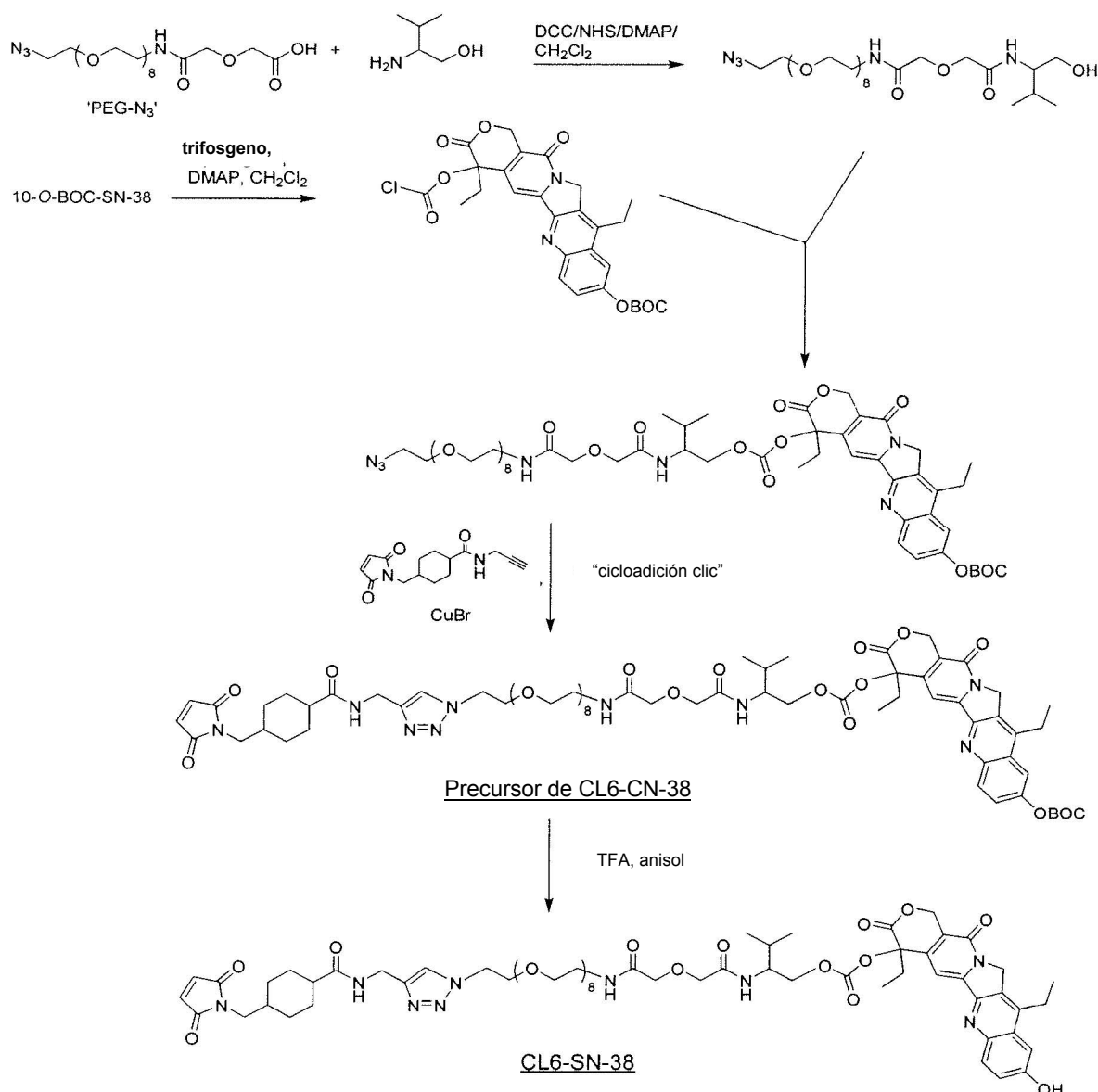
Ejemplo 1: preparación de CL6-SN-38

20 El CL6-SN-38 se representa en el esquema 1. Se activó el O-(2-azidoetil)-O'-(*N*-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol comercial ('PEG-N₃'; 227 mg) con DCC (100 mg), NHS (56 mg), y una cantidad catalítica de DMAP en 10 ml de diclorometano durante 10 minutos. A esta mezcla se añadió L-valinol (46.3 mg), y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La filtración, seguida por la remoción del disolvente y cromatografía ultrarrápida, proporcionó 214 mg de material aceitoso y transparente. Este intermediario (160 mg) se hizo reaccionar con 10-O-BOC-SN-38-20-O-cloroformato, este último generado a partir de 10-O-BOC-SN-38 (123 mg), usando trifosgeno y DMAP. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo en 4 ml de diclorometano durante 10 minutos, y la mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida para obtener 130 mg (rendimiento del 45 %) del producto como material espumoso. HPLC: *t_R* 11,80 min; espectro de masas por electrospray: M+Na: m/z 1181.

30 El reactivo acetilénico con contenido de maleimida, es decir 4-(*N*-maleimidometil)-*N*-(2-propinil)ciclohexan-1-carboxamida, requerido para la cicloadición clic, se preparó haciendo reaccionar 0,107 g de SMCC y 0,021 ml de propargilamina (0,018 g; 1,01 equiv.) en diclorometano, usando 1.1 equiv. de diisopropiletilamina. Tras 1 hora, el disolvente se eliminó y el producto se purificó por cromatografía ultrarrápida para obtener 83 mg del producto (polvo incoloro). El espectro de masas por electrospray demostró picos a m/e 275 (M+H) y un pico de base a m/e 192 en el modo de iones positivos, lo cual es coherente con la estructura calculada para C₁₅H₁₈N₂O₃: 275.1390 (M+H), hallado: 275,1394 (masa exacta).

40 El intermediario azido (126 mg) antes descrito se disolvió en DMSO (1,5 ml) y agua (0,4 ml), y se hizo reaccionar con 60 mg de 4-(*N*-maleimidometil)-*N*-(2-propinil)ciclohexan-1-carboxamida y 15 mg de bromuro cuproso y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La cromatografía ultrarrápida, después de trabajar la mezcla de reacción, proporcionó 116 mg (75 % de rendimiento) del producto de cicloadición. HPLC: *t_R* 11.20 minutos; espectro de masas por electrospray: M+H y M+Na a m/z 1433 y 1456, respectivamente. Por último, la desprotección con una mezcla de TFA (5 ml), diclorometano (1 ml), anisol (0,1 ml) y agua (0.05 ml), seguida por la precipitación con éter y la posterior cromatografía ultrarrápida, proporcionó el producto, CL6-SN-38, como material gomoso. HPLC: *t_R* 9,98 minutos; espectro de masas por electrospray: M+H y M-H (modo de iones negativos) a m/z 1333 y 1356, respectivamente.

Esquema 1

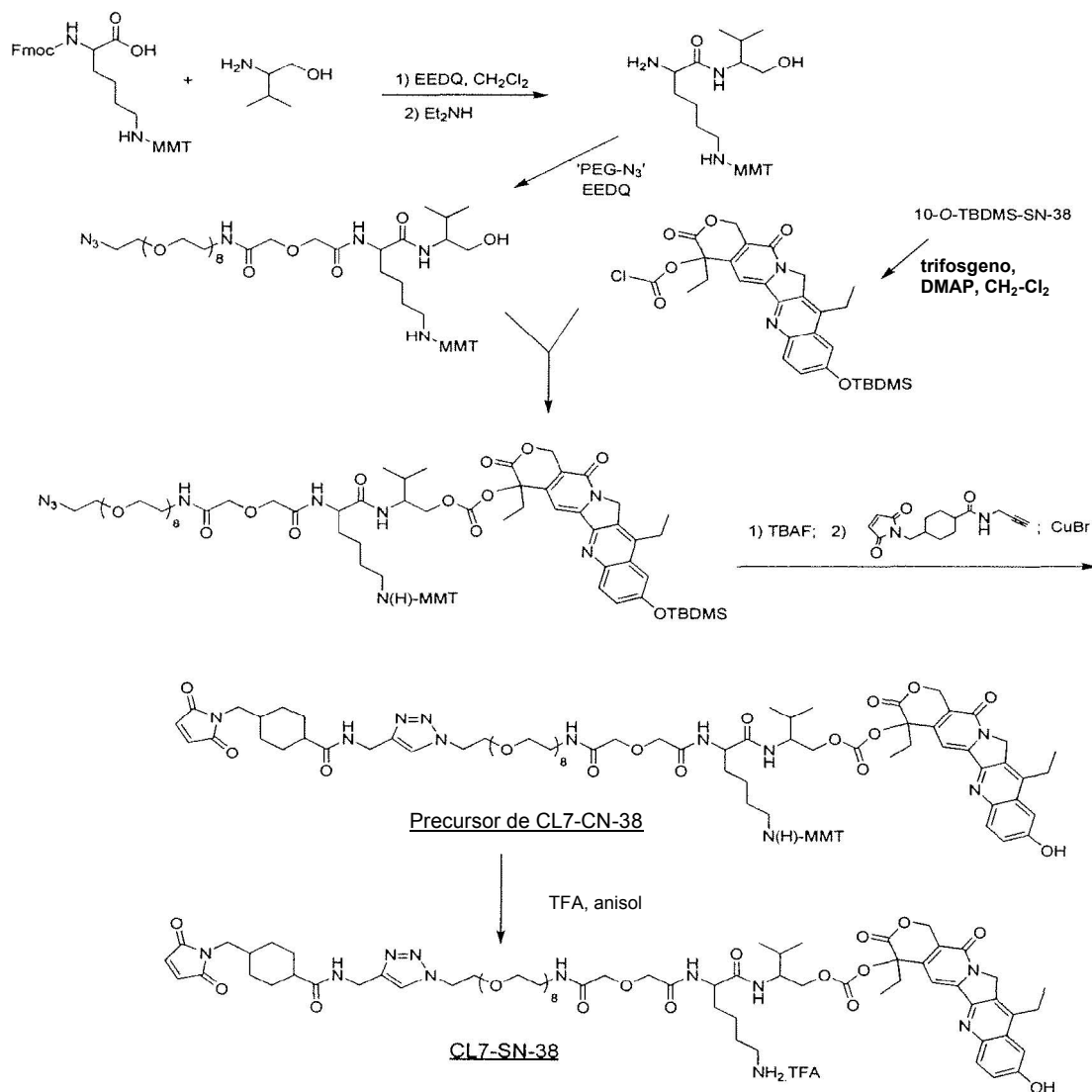


Ejemplo 2: preparación de CL7-SN-38

- La síntesis se muestra esquemáticamente en el esquema 2. El L-Valinol (40 mg) se hizo reaccionar con el Fmoc-Lys(MMT)-OH comercial (253 mg) y EEDQ (107 mg) en 10 ml de diclorometano anhidro a temperatura ambiente, bajo argón, durante 3 horas. El trabajo de extracción, seguido por cromatografía ultrarrápida, proporcionó el producto Fmoc-Lys(MMT)-valinol, como un líquido amarillo claro (200 mg; ~ 70 % de rendimiento). HPLC: t_R 14,38 min; espectro de masas por electrospray: M+H: m/z 727. Este intermediario (200 mg) se desprotegió con dietilamina (10 ml), y el producto (135 mg) se obtuvo en ~ 90 % de pureza después de la cromatografía ultrarrápida. HPLC: t_R 10,91 min; espectro de masas por electrospray: M+Na a m/z 527. Este producto (135 mg) se acopló con el O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol comercial ('PEG-N₃'; 150 mg, 1,1 equiv.) en presencia de EEDQ (72 mg, 1,1 equiv.) en 10 ml de diclorometano, y se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. El material en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para obtener 240 mg del producto purificado como un aceite amarillo claro (~87 % de rendimiento). HPLC: t_R 11,55 min; espectro de masas por electrospray: M+H y M+Na a m/z 1041 y 1063, respectivamente.
- Este intermediario (240 mg) se hizo reaccionar con 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-clorofornato, este último generado a partir de 10-O-TBDMS-SN-38 (122 mg) usando trifosgeno y DMAP. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo en 5 ml de diclorometano, durante 10 minutos, y la mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida para obtener 327 mg del producto como una espuma amarilla clara. Espectro de masas por electrospray: M+H a m/z 1574. El producto entero se hizo reaccionar con 0,25 mmol de TBAF, en 10 ml de diclorometano durante 5 minutos, y la mezcla de reacción se diluyó a 100 ml y se lavó con salmuera. El producto en bruto (250 mg) se disolvió en

- 5 DMSO (2 ml) y agua (0,4 ml), y se hizo reaccionar con 114 mg de 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexan-1-carboxamida (que se preparó como se describe en el ejemplo 1) y 30 mg de bromuro cuproso y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La cromatografía ultrarrápida proporcionó 150 mg del penúltimo intermediario. Finalmente, la desprotección del grupo MMT con una mezcla de TFA (0,5 ml) y anisol (0,05 ml) en diclorometano (5 ml) durante 3 minutos, seguido por la purificación por cromatografía ultrarrápida, proporcionó 69 mg de CL7-SN-38 como un material gomoso. HPLC: t_R 9,60 min; espectro de masas por electrospray: M+H y M-H (modo de iones negativos) a m/z 1461 y 1459, respectivamente.

Esquema 2

Ejemplo 3: preparación de CL6-SN-38-10-O-CO₂Et

- 10 El CL6-SN-38 del ejemplo 1 (55,4 mg) se disolvió en diclorometano (5 ml), y se hizo reaccionar con etilcloroformato (13,1 mg; 11,5 ml) y diisopropiletilamina (52,5 mg; 71 ml), y se agitó durante 20 minutos bajo argón. La mezcla de reacción se diluyó con 100 ml de diclorometano, y se lavó con 100 ml cada uno de HCl 0,1 M, bicarbonato de sodio semisaturado y salmuera, y se secó. La cromatografía ultrarrápida, después de la remoción del disolvente, proporcionó 59 mg del producto del título. HPLC: t_R 10,74 min; masa exacta: calc. 1404,6457 (M+H) y 1426,6276 (M+Na); hallado: 1404,6464 (M+H) y 1426,6288 (M+Na).
- 15

Ejemplo 4: preparación de CL7-SN-38-10-O-CO₂Et

- 20 El precursor de CL7-SN-38 del ejemplo 2 (80 mg) se convirtió en el 10-O-cloroformato, usando el procedimiento y la purificación como se describe en el ejemplo 3. Rendimiento: 60 mg. HPLC: t_R 12,32 min; espectro de masas por electrospray: M+H y M-H (modo de iones negativos) a m/z 1806 y 1804, respectivamente. La desprotección de este material usando ácido dicloroacético y anisol en diclorometano proporcionó el producto del título. HPLC: t_R 10,37 min; espectro de masas por electrospray: M+H a m/z 1534.

Ejemplo 5: preparaciones de CL6-SN-38-10-O-COR y CL7-SN-38-10-O-COR

Este ejemplo demuestra que el grupo 10-OH del SN-38 está protegido como carbonato o un éster, en lugar de cómo 'BOC', de modo que el producto final esté listo para la conjugación con los anticuerpos sin necesidad de desproteger el grupo 10-OH protector. Este grupo ya está desprotegido en condiciones de pH fisiológicas después de la administración *in vivo* del conjugado proteico. En estos conjugados, 'R' puede ser un alquilo sustituido, tal como $(\text{CH}_2)_n\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ donde n es 2-10, o un alquilo simple, tal como $(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3$ donde n es de 0-10, o puede ser una parte alcoxi, tal como " $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n\text{-O-}$ " donde n es 0-10, o una parte alcoxi sustituida, tal como $\text{O-(CH}_2)_n\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ donde n es 2-10 y donde el grupo terminal amino se encuentra opcionalmente en forma de una sal cuaternaria para una mejor solubilidad acuosa, o " $\text{R}_1\text{O-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ ", donde R_1 es etilo o metilo y n es un número entero con valores de 0-10. En la versión más simple de la última categoría, $\text{R} = \text{"O-(CH}_2)_2\text{-OCH}_3\text{"}$. Estos derivados de 10-hidroxi se preparan fácilmente por tratamiento con el clorofornato del reactivo seleccionado, si el derivado final debe ser un carbonato. Típicamente, la camptotecina que contiene 10-hidroxi, tal como SN-38, se trata con un equivalente molar del clorofornato en dimetilformamida usando trietilamina como la base. En estas condiciones, la posición 20-OH no se ve afectada. Para formar 10-O-ésteres, se usa el cloruro ácido del reactivo seleccionado. Tales derivatizaciones se logran convenientemente usando intermediarios avanzados, tales como se ilustra para los carbonatos de etilo simple de los ejemplos 3 y 4.

Ejemplo 6: preparación de CL6-paclitaxel

El valinol se acopla al 'PEG-N3' del esquema 1, según el procedimiento que se describe en el ejemplo 1. El producto se hace reaccionar con 0,4 equivalentes molares de trifosgeno, 3,1 equivalentes molares de DMAP, en diclorometano. Después de 5 minutos, el clorofornato formado de esta manera se hace reaccionar con una cantidad equimolar de paclitaxel durante 15 minutos, a temperatura ambiente. El grupo 2'-hidroxilo reactivo del paclitaxel (el grupo hidroxilo secundario de cadena lateral) reacciona con el clorofornato del enlazador cruzado. El producto se aísla por cromatografía ultrarrápida. Este intermediario (0,1 mmol) se disuelve en DMSO (1,5 ml) y agua (0,4 ml), y se hace reaccionar con 60 mg de 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexan-1-carboxamida (preparada como se describe en el ejemplo 1) y 15 mg de bromuro cuproso y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. La cromatografía ultrarrápida, después del trabajo de la mezcla de reacción, proporciona el paclitaxel bifuncional, es decir, CL6-paclitaxel.

Ejemplo 7: preparación de CL7-paclitaxel

El L-Valinol (40 mg) se hace reaccionar con el Fmoc-Lys(MMT)-OH comercial, y el producto luego se hace reaccionar con O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N₃'), como se describe en el ejemplo 2. El clorofornato de este derivado se forma mediante el método del ejemplo 6, y se hace reaccionar con una cantidad equimolar de paclitaxel. El grupo 2'-hidroxilo reactivo de paclitaxel (el grupo hidroxilo secundario de cadena lateral) reacciona con el clorofornato del enlazador cruzado. La cicloadición clic, usando 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexan-1-carboxamida (preparada como se describe en el ejemplo 1) se realiza después de una manera similar a la que se ha descrito en el ejemplo 6, y el producto finalmente se trata con ácido dicloroacético y anisol, para efectuar la remoción del grupo 'MMT' en condiciones suaves. Este procedimiento proporciona CL7-paclitaxel.

Ejemplo 8: preparación de CL6-[morfolino doxorubicina]

El valinol se acopla con el 'PEG-N3' del esquema 1, según el procedimiento descrito en el ejemplo 1. El producto se hace reaccionar con 0,4 equivalentes molares de trifosgeno, 3,1 equivalentes molares de DMAP, en diclorometano. Después de 5 minutos, el clorofornato formado de esta manera se hace reaccionar con una cantidad equimolar de morfolino doxorubicina durante 15 minutos a temperatura ambiente. El grupo hidroxilo primario de morfolino doxorubicina reacciona con el clorofornato del enlazador cruzado. El producto se aísla por cromatografía ultrarrápida. Este intermediario (0,1 mmol) se disuelve en DMSO (1,5 ml) y agua (0,4 ml), y se hace reaccionar con 60 mg de 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexan-1-carboxamida (preparada como se describe en el ejemplo 1) y 15 mg de bromuro cuproso y se agita durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La cromatografía ultrarrápida, después del trabajo de la mezcla de reacción, proporciona el paclitaxel bifuncional, es decir CL6-[morfolino doxorubicina].

Ejemplo 9: preparación de CL7-[morfolino doxorubicina]

El L-Valinol (40 mg) se hace reaccionar con el Fmoc-Lys(MMT)-OH comercial, y el producto luego se hace reaccionar con O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N₃'), como se describe en el ejemplo 2. El clorofornato de este derivado se forma mediante el método del ejemplo 6, y se hace reaccionar con una cantidad equimolar de morfolino doxorubicina. El grupo hidroxilo primario de la morfolino doxorubicina reacciona con el clorofornato del enlazador cruzado. La cicloadición clic, usando 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexan-1-carboxamida (preparada como se describe en el ejemplo 1) se realiza después, de una manera similar a la que se ha descrito en el ejemplo 6, y el producto finalmente se trata con ácido dicloroacético y anisol para efectuar la remoción del grupo 'MMT' en condiciones suaves. Este procedimiento proporciona CL7-[morfolino doxorubicina].

Ejemplo 10: preparación de CL2A-SN-38

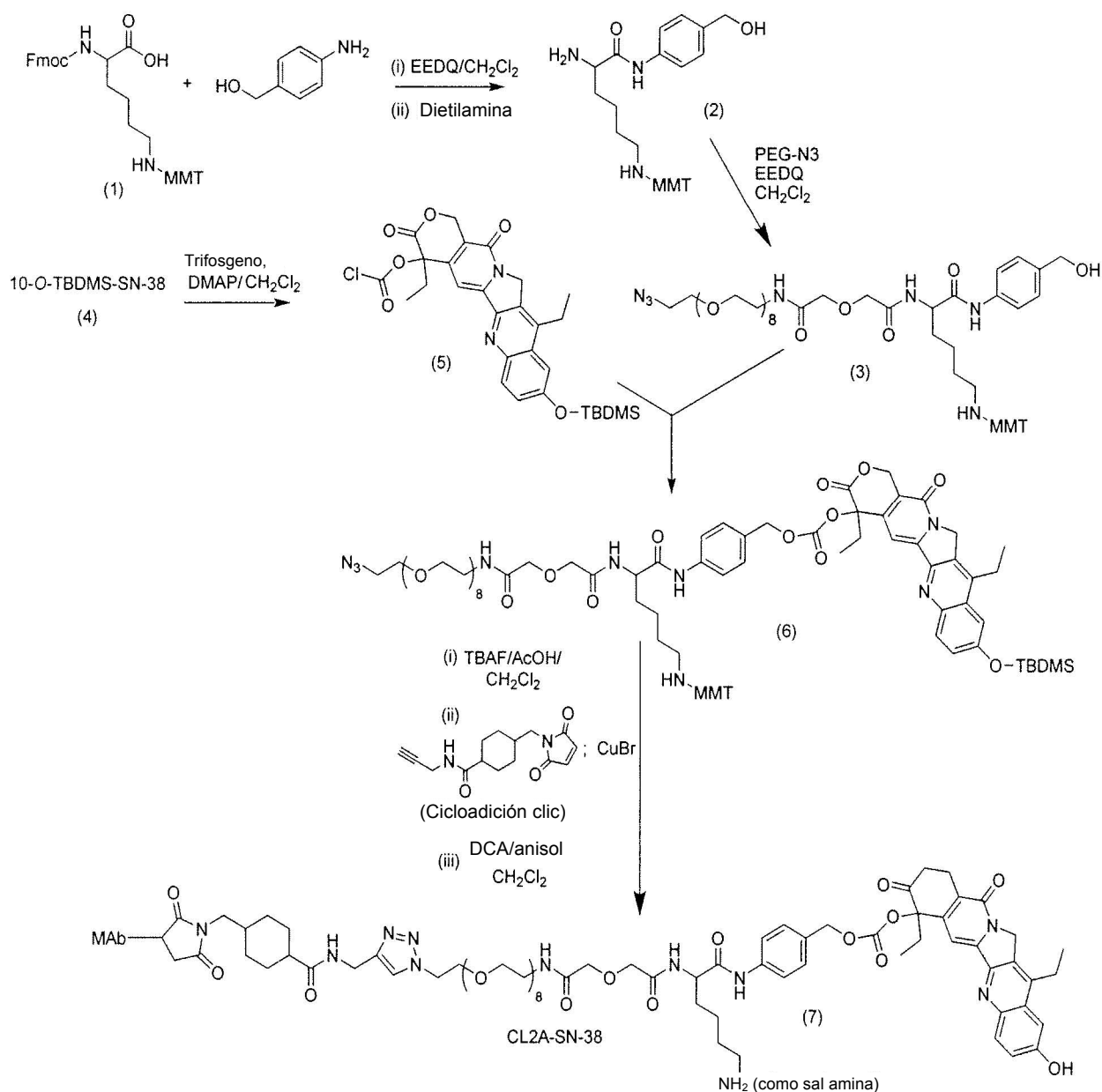
5 A la mezcla de Fmoc-Lys(MMT)-OH comercial (0,943 g) y alcohol *p*-aminobencílico (0,190 g) en cloruro de metileno (10 ml), se le añadió EEDQ (0,382 g) a temperatura ambiente y se agitó durante 4 horas. El trabajo de extracción seguido por cromatografía ultrarrápida rindió 1,051 g del material como una espuma blanca. Todos los análisis de HPLC se llevaron a cabo por el Método B, conforme se indica en 'General', en la sección 0148. Tiempo de ret. de la HPLC: 3,53 minutos. El espectro de masas por electrospray mostró picos en *m/e* 745,8 (M+H) y *m/e* 780,3 (M+Cl), lo cual es coherente con la estructura. Este intermediario (0,93 g) se disolvió en dietilamina (10 ml) y se agitó durante 2 horas. Después de la remoción del disolvente, el residuo se lavó en hexano para obtener 0,6 g del intermediario ((2) en el esquema 3), como un precipitado incoloro (91,6 % puro por HPLC). Tiempo de retención de la HPLC: 2.06 min. El espectro de masas por electrospray mostró picos en *m/e* 523.8 (M+H), *m/e* 546.2 (M+Na) y *m/e* 522.5 (M-H).

10 Este intermediario en bruto (0,565 g) se acopló con el O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicilil-2-aminoetil)heptaetilenglicol comercial ('PEG-N3', 0,627g) usando EEDQ en cloruro de metileno (10 ml). La remoción del disolvente y la cromatografía ultrarrápida rindieron 0,99 g del producto ((3) en el esquema 3; aceite amarilla; 87 % de rendimiento). Tiempo de retención de la HPLC: 2.45 min. El espectro de masas por electrospray mostró picos en *m/e* 1061,3 (M+H), *m/e* 1082,7 (M+Na) y *m/e* 1058.8(M-H), de un modo coherente con la estructura. Este intermediario (0,92 g) se hizo reaccionar con 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-cloroformato ((5) en el esquema 3) en cloruro de metileno (10 ml) durante 10 minutos bajo argón. La mezcla se purificó por cromatografía ultrarrápida, para obtener 0,944g como un aceite amarillo claro ((6) en el esquema 3; rendimiento = 68 %). Tiempo de retención de la HPLC: 4,18 min. A este intermediario (0,94 g) en cloruro de metileno (10 ml) se le añadió la mezcla de TBAF (1M en THF, 0,885 ml) y ácido acético (0,085 ml) en cloruro de metileno (3 ml), luego se agitó durante 10 minutos. La mezcla se diluyó con cloruro de metileno (100 ml), se lavó con citrato de sodio 0,25 M y salmuera. La remoción del disolvente rindió 0,835 g del producto aceitoso amarillo. Tiempo de retención de la HPLC: 2,80 min., (99 % de pureza). El espectro de masas por electrospray mostró picos en *m/e* 1478 (M+H), *m/e* 1500.6 (M+Na), *m/e* 1476.5 (MH), *m/e* 1590.5 (M+TFA), de un modo coherente con la estructura.

25 Este intermediario SN-38 derivado de azido (0,803 g) se hizo reaccionar con 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexan-1-carboxamida (0,233 g) en cloruro de metileno (10 ml), en presencia de CuBr (0,0083 g.), DIEA (0,01 ml) y trifetilfosfina (0,015 g), durante 18 horas. El trabajo de extracción, incluso el lavado con EDTA 0,1M (10 ml), y la cromatografía ultrarrápida rindieron 0,891 g como una espuma amarilla. (Rendimiento = 93 %). Tiempo de retención de la HPLC: 2,60 minutos. El espectro de masas por electrospray mostró picos en *m/e* 1753,3 (M+H), *m/e* 1751,6 (M-H), 1864,5 (M+TFA), de un modo coherente con la estructura. Finalmente, la desprotección del penúltimo intermediario (0,22 g) con una mezcla de ácido dicloroacético (0,3 ml) y anisol (0,03 ml) en cloruro de metileno (3 ml), seguida por la precipitación con éter rindió 0,18 g (97 % de rendimiento) de CL2A-SN-38; (7) en el esquema 3) como un polvo amarillo claro. Tiempo de retención de la HPLC: 1,88 min. El espectro de masas por electrospray mostró picos en *m/e* 1480,7 (M+H), 1478.5 (MH), de un modo coherente con la estructura.

30

Esquema 3: preparación de CL2A-SN-38



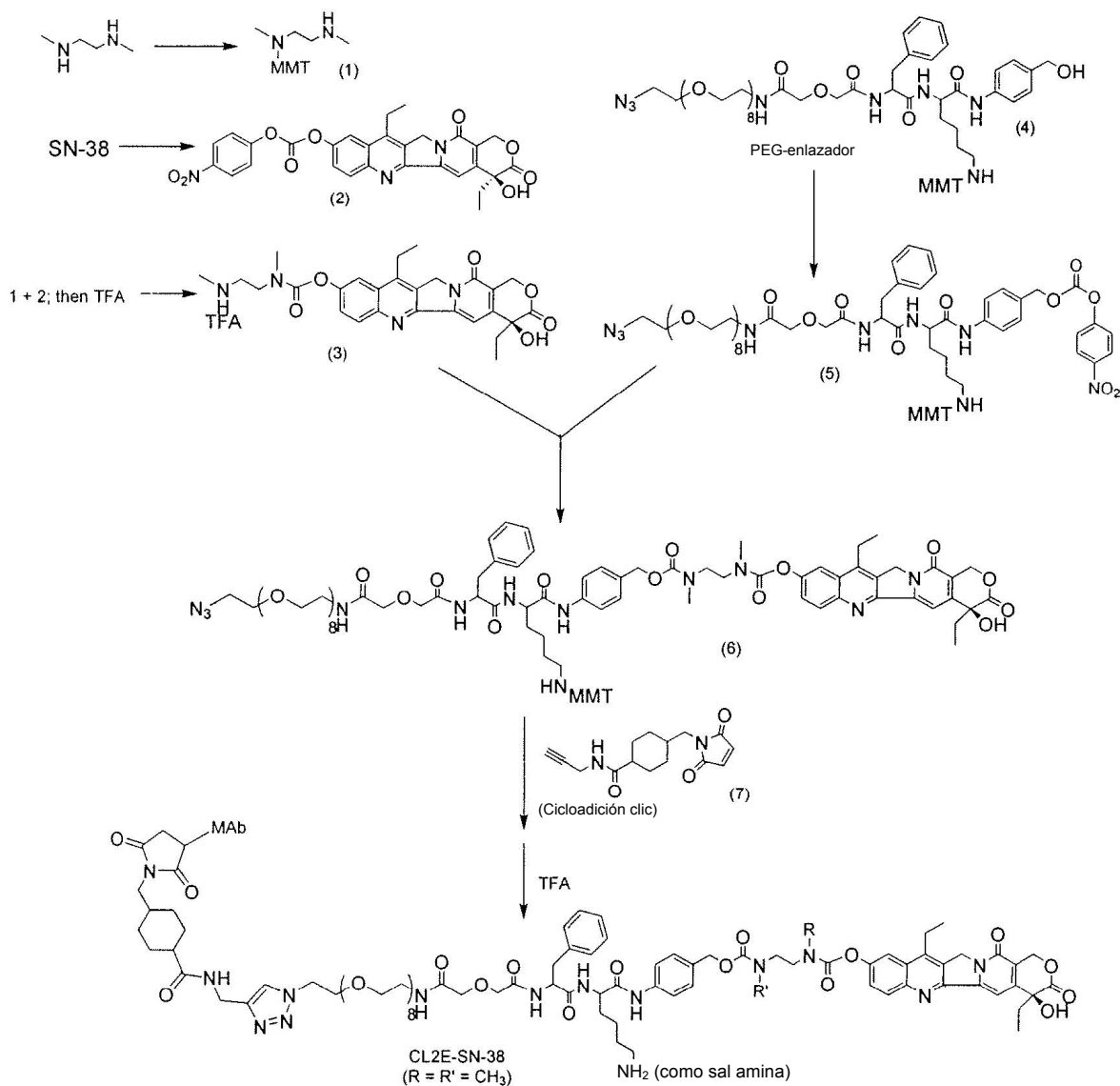
Ejemplo 11: preparación de CL2E-SN-38

Se hizo reaccionar N,N'-dimetiletilendiamina (3 ml) en cloruro de metileno (50 ml) con cloruro de monometoxitritilo (1,7 g). Después de 1 hora de agitación, el disolvente se eliminó a presión reducida, y el producto en bruto se recuperó por trabajo de extracción (aceite amarillo; 2,13 g). Todos los análisis de HPLC se llevaron a cabo por el método B, como se indica en 'General', en la sección 0148. Tiempo de retención de la HPLC: 2,28 minutos. Este intermediario ((1) en el esquema 4; 0,93g) se añadió *in situ* al SN38 activado, y el último ((2) en el esquema 4) se preparó haciendo reaccionar SN-38 (0,3 g) con *p*-nitrofenilclorocarbonato (0,185 g) y DIEA (0,293 ml) en DMF durante 1 hora. Después de eliminar el disolvente, el residuo se purificó en gel de sílice desactivado para obtener 0,442 g como un sólido blanco.

Este intermediario (0,442 g) se desprotegió con una mezcla de ácido trifluoroacético (1 ml) y anisole (0,1 ml) en cloruro de metileno (5 ml), a lo cual siguió la precipitación con éter para obtener 0,197 g del producto ((3) en el esquema 4) como un sólido blanco. Este intermediario ((3); 0,197g) se acopló con el enlazador de PEG activado con dipéptido incorporado que contenía azida ((5) en el esquema 4), activación esta que se llevó a cabo haciendo reaccionar PEG-enlazador ((4) en el esquema 4; 0,203 g) con bis(4-nitrofenil) carbonato (0,153 g) y DIEA (0,044 ml) en cloruro de metileno (8 ml). La cromatografía ultrarrápida rindió 0,2 g del producto intermediario SN-38 derivado de

azida ((6) en el esquema 4), como un sólido vidrioso. Tiempo de retención de la HPLC: 2,8 min. El espectro de masas por electrospray mostró picos en m/e 1740,5 (M+H), m/e 1762,9 (M+Na), m/e 1774,9 (M+Cl⁻), de un modo coherente con la estructura. Este intermediario ((6) en el esquema 4; 0,2 g) se sometió a cicloadición clic con 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexan-1-carboxamida (0,067 g) en cloruro de metileno, en presencia de CuBr (0,007 g.), DIEA (0,008 ml) y trifetilfosfina (0,012 g) durante 18 horas. El trabajo de la mezcla de reacción, que incluyó el tratamiento con EDTA 0,1M, seguido por cromatografía ultrarrápida rindió 0,08 g del penúltimo intermediario como una espuma amarilla clara. HPLC: t_R = 2,63 min. El espectro de masas por electrospray mostró picos en m/e 2035.9 (M+Na⁺), m/e 2047.9 (M+Cl⁻), de un modo coherente con la estructura. Finalmente, la desprotección de este intermediario (0,08 g) con una mezcla de ácido trifluoroacético (0,2 ml), anisol (0,12 ml) y agua (0,06 ml) en cloruro de metileno (2 ml), seguida por la precipitación con éter rindió 0,051 g del producto, CL17-SN38 (también denominado CL2E-SN-38), como un polvo amarillo claro (rendimiento = 69 %). Tiempo de retención de la HPLC: 1,95 min., -99 % de pureza. El espectro de masas por electrospray mostró picos en m/e 1741,1 (M+H), 1775,5 (M+Cl⁻), de un modo coherente con la estructura.

Esquema 4: preparación de CL2E-SN-38



15 Ejemplo 12: conjugación de los productos SN-38 bifuncionales con anticuerpos levemente reducidos

El MAb anti-CEACAM5 humanizado, hMN-14, el MAb anti-CD22 humanizado, hLL2, el MAb anti-CD20 humanizado, hA20, el MAb anti-EGP-1 humanizado, hRS7 y el MAb anti-mucina humanizado, hPAM4, se usaron en estos estudios. Cada anticuerpo se redujo con ditioneitol (DTT), se usó en un exceso molar de 50 a 70 veces, en PBS 40 mM, pH 7,4, que contenía EDTA 5,4 mM, a 37 °C (baño) durante 45 minutos. El producto reducido se purificó por

5 cromatografía por exclusión de tamaños y/o diafiltración, y se intercambió con tampón en un tampón adecuado a un pH de 6,5. El contenido de tiol se determinó por ensayo de Ellman, y se ubicó en el intervalo de 6,5 a 8,5 SH/IgG. De manera alternativa, los anticuerpos se redujeron con Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) en tampón de fosfina, a un pH en el intervalo de 5-7, seguido por conjugación *in situ*. El MAb reducido se hizo reaccionar con un exceso molar de ~10 a 15 veces de 'CL6-SN-38' del ejemplo 1, o 'CL7-SN-38' del ejemplo 2, o 'CL6SN-38-10-O-CO₂Et' del ejemplo 3, o 'CL7-SN-38-10-O-CO₂Et' del ejemplo 4, CL2A-SN-38 del ejemplo 10, o CL2ESN-38 del ejemplo 11, usando DMSO al 7-15 % v/v como cosolvente e incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente. El conjugado se purificó por SEC centrifugado, pasaje por una columna hidrofóbica y finalmente, por ultrafiltración-diafiltración. El producto se sometió a ensayo para SN-38 por absorbancia a 366 nm y se correlacionó con valores estándar, mientras la concentración de la proteína se dedujo de la absorbancia a 280 nm, se corrigió para subsanar el derrame de absorbancia de SN-38 en esta longitud de onda. De este modo, se determinaron las relaciones de sustitución de SN-38/MAB. Los conjugados purificados almacenados como formulaciones liofilizadas en viales de vidrio, se taparon al vacío y se almacenaron en un congelador a -20 °C. Las relaciones de sustitución molar (MSR, *molar substitution ratios*) de SN-38 obtenidas para algunos de estos conjugados, que típicamente estuvieron en el intervalo de 5 a 7, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: relaciones de sustitución molar (MSR) de SN-38/MAB en ciertos conjugados

MAB	Conjugado	MSR
	hMN-14-[CL2A-SN-38], utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 10	6,1
	hMN-14-[CL6-SN-38], utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 1	6,8
hMN-14	hMN-14-[CL7-SN-38], utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 2	5,9
	hMN-14-[CL7-SN-38-10-O-CO ₂ Et], utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 4	5,8
	hMN-14-[CL2E-SN-38], utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 11	5,9
	hRS7-CL2A-SN-38 utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 10	5,8
hRS7	hRS7-CL7-SN-38 utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 2	5,9
	hRS7-CL7-SN-38 (Et) utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 4	6,1
hA20	hA20-CL2A-SN-38 utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 10	5,8
hLL2	hLL2-CL2A-SN-38 utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 10	5,7
hPAM4	hPAM4-CL2A-SN-38 utilizando el enlazador farmacológico del ejemplo 10	5,9

Ejemplo 15 [SIC]: eficacias terapéuticas *in vivo* en modelos preclínicos del carcinoma pancreático o de colon humano

20 Se trataron unas ratonas atímicas sin pelo inmunocomprometidas, portadoras de xenoinjertos subcutáneos de tumor pancreático o de colon humano con conjugado CL2A-SN-38 específico o con conjugado de control, o se dejaron sin tratar. Se observaron las eficacias terapéuticas de los conjugados específicos. La figura 1 muestra un modelo de tumor pancreático Capan 1, donde los conjugados CL2A-SN-38 específicos de los anticuerpos hRS7 (anti-EGP-1), hPAM4 (anti-mucina), y hMN-14 (anti-CEACAM5) demostraron mejores eficacias que el conjugado hA20-CL2A-SN-38 (anti-CD20) de control y el control no tratado. De un modo similar en un modelo BXPC3 de cáncer pancreático humano, el hRS7-CL2A-SN-38 específico demostró una mejor eficacia terapéutica que los tratamientos de control (figura 2). Del mismo modo, en un modelo LS174T agresivo de carcinoma de colon humano, el tratamiento con hMN-14-CL2A-SN-38 específica fue más eficaz que no implementar tratamiento (figura 3).

30 Ejemplo 16: eliminación de la infección por VIH mediante el tratamiento con un conjugado de SN-38 de un MAB anti-gp120

Un MAB dirigido al anticuerpo anti-gp120 de la proteína gp120 de la envuelta del VIH, tal como P4/D10, se reduce usando las condiciones descritas en el ejemplo 7, y el MAB reducido se hace reaccionar con un exceso molar de 20 veces del enlazador del fármaco CL7SN-38, que es tal como se describe en el ejemplo 2. Se obtiene un conjugado anti-gp120-SN-38 con una sustitución de ~ 8 moléculas de fármaco por anticuerpo. Un ensayo de inhibición de VIH *in vitro* con dicho conjugado se lleva a cabo usando diversas mezclas de células Jurkat-T no infectadas y células Jurkat-T totalmente infectadas (en las relaciones de 99,8:0,2 a 95:5), y tratando con diluciones en serie del

5 conjugado, del conjugado de control hRS7-CL7-SN38 no específico, del anticuerpo desnudo y del suero VIH negativo desde 100 hasta 0,00001 mg/ml. Las células tratadas de este modo se incuban en un medio de cultivo RPMI 1640 a 37 °C durante 7 días, y luego se sometieron a ensayo para determinar la inhibición del VIH por análisis ELISA. Este experimento demuestra una fuerte inhibición específica de la diseminación intercelular el VIH por el fármaco conjugado específica. La eficacia *in vivo* se pone a prueba administrando a unos ratones isólogos células infectadas con el VIH junto con conjugados SN-38 específicos y no específicos. Para esto, se transfieren unos esplenocitos murinos primarios infectados con el virus seudotipo de VIH-1/MuLV por vía intraperitoneal a unos grupos de ratones, en simultáneo con la administración del inmunoconjugado. Las células peritoneales se cosecharon 10 días más tarde. En tanto que la presencia de VIH infecciosa se demuestra en los ratones de control, el VIH no infeccioso se detecta en ratones tratados con 100 mg o menos del conjugado anti-gp120-SN-38. No se observa protección con ratones tratados con conjugados de control.

Listado de secuencias

15 <110> IMMUNOMEDICS, INC.

<120> INMUNOCONJUGADOS CON UNA UNIÓN ESCINDIBLE INTRACELULARMENTE

<130> I 10121 EP

20 <140> EP 09 840 166.4

<141> 2009-12-02

<150> 61/207,890

<151> 2009-02-13

25

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

30 <210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 1

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

40 <210> 2

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 <400> 2

ES 2 640 013 T3

Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe
20 25 30

Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40 45

<210> 3
<211> 17
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

10 **Ala**

<210> 4
<211> 21
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile
1 5 10 15

Gln Gln Ala Gly Cys
20

20 <210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 5

30 Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp Tyr Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Ala

35 <210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 6

Gln Ile Glu Tyr Lys Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
 1 5 10 15

Ala

5 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 7

Gln Ile Glu Tyr His Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
 1 5 10 15

Ala

15 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 8

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
 1 5 10 15

Ala

30 <210> 9
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 9

Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu
 1 5 10 15

Gln Val Lys Ala Ala Gly Ala Tyr
 20

40 <210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>

ES 2 640 013 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 10

Leu Glu Gln Tyr Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala
1 5 10 15

5 Thr Glu

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 11

Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser Asp Val
1 5 10 15

Phe Gln Gln Cys
20

<210> 12

20 <211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

25

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Asp Val Glu Asn
1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

<210> 13

30 <211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Asp Val Glu Asn
1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

35

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 640 013 T3

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Asp Val Glu Asn
1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
 20 25

5 <210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

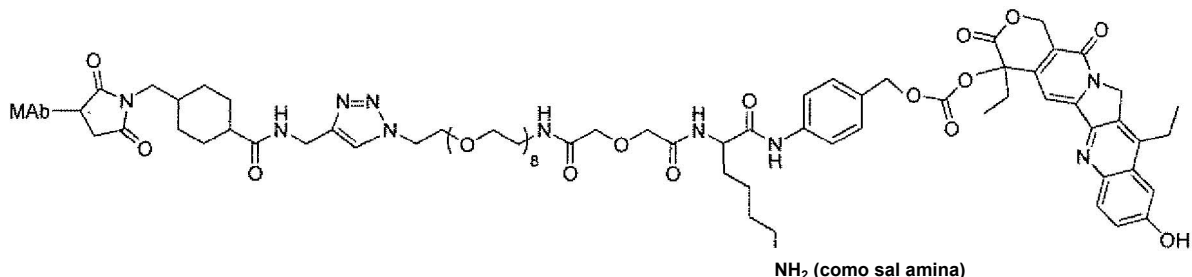
10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 15

Ala Leu Ala Leu
1

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que tiene una fórmula estructural de MAb-CL2A-SN-38, con una estructura representada por:



- 5 2. El conjugado según la reivindicación 1, en el que el MAb se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo primatizado, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fab', un fragmento de anticuerpo F(ab)₂, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂ y un fragmento de anticuerpo scFv.
- 10 3. El conjugado según la reivindicación 1, en el que el MAb es un anticuerpo monoclonal quimérico, primatizado, humanizado o humano y dicho anticuerpo tiene dominios constantes y un dominio bisagra de una IgG1 humana o un anticuerpo de IgG4 humana.
4. El conjugado según la reivindicación 3, en el que el MAb tiene dominios constantes y un dominio bisagra de un anticuerpo de IgG4 humana, donde la serina 228 de la bisagra se reemplaza por prolina.
- 15 5. El conjugado según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo tiene dominios constantes, y la bisagra de un anticuerpo de la IgG1 humana y donde uno o más aminoácidos de Fc se han mutado para incrementar la semivida del anticuerpo en la sangre, o en el que uno o más grupos de azúcar del Fc se han eliminado, o uno o más grupos de azúcar se han añadido para incrementar la semivida en sangre del anticuerpo.
6. El conjugado según la reivindicación 2, en el que dicho MAb se selecciona del grupo que consiste en hLL1, hLL2, RFB4, hA19, hA20, hRS7, hPAM4, hMN-3, hMN-14, hMu-9, hR1, CC49, hL243, D2/B y himmu-31.
- 20 7. El conjugado según la reivindicación 2, en el que dicho MAb se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: anhidrasa carbónica IX, B7, CCCL19, CCCL21, CSAp, HER-2/*neu*, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD 14, CD15, CD16, CD18, CD 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM5, CEACAM-6, alfa-fetoproteína (AFP), VEGF, ED-B fibronectina, EGP-1, EGP-2, receptor de EGF (ErbB1), ErbB2, ErbB3, Factor H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, Ga 733, GROB, HMGB-1, factor inducible de la hipoxia (HIF), HM1.24, HER-2/*neu*, factor de crecimiento del tipo insulina (ILGF), IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IL-2R, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, IGF-1R, Ia, HM1.24, gangliósidos, HCG, HLA-DR, CD66a-d, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, factor de crecimiento de la placenta (PIGF), PSA (antígeno prostático específico), PSMA, dímero de PSMA, antígeno de PAM4, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM, KS-1, Le(y), mesotelina, S100, tenascina, TAC, antígeno de Tn, antígenos de Thomas-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, antígenos de angiogénesis tumoral, TNF-α, receptor de TRAIL (R1 y R2), VEGFR, RANTES, T101, antígenos de células madre cancerígenas, factores de complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, y un producto oncogénico.
- 25 8. El conjugado según la reivindicación 2, en el que dicho MAb es multiespecífico, con múltiples brazos de unión a la diana, al menos dos antígenos o epítopos diferentes contenidos en la célula o en el patógeno diana y con uno o más brazos direccionadores que están conjugados a CPT.
- 30 9. El conjugado según la reivindicación 8, en el que dicho MAb multiespecífico es un constructo de anticuerpos biespecíficos y/o bivalentes que comprenden uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en hLL1, hLL2, RFB4, hA19, hA20, hRS7, hPAM4, hMN-3, hMN-14, hMu-9, hR1, CC49, hL243, D2/B y himmu-31.
- 35 10. El conjugado según la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo multiespecífico se une a dos o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en anhidrasa carbónica IX, B7, CCCL19, CCCL21, CSAp, HER-2/*neu*, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM5, CEACAM-6, alfa-fetoproteína (AFP), VEGF, ED-B fibronectina, EGP-1, EGP-2, receptor de EGF (ErbB1), ErbB2, ErbB3, Factor H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, Ga 733, GROB, HMGB-1, factor inducible de la hipoxia (HIF), HM1.24, HER-2/*neu*, factor de crecimiento del tipo insulina (ILGF), IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IL-2R, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, IGF-1R, Ia, HM1.24, gangliósidos,
- 40
- 45

- HCG, HLA-DR, CD66a-d, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, factor de crecimiento de la placenta (PIGF), PSA (antígeno prostático específico), PSMA, dímero de PSMA, antígeno de PAM4, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM, KS-1, Le(y), mesotelina, S100, tenascina, TAC, antígeno de Tn, antígenos de Thomas-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, antígenos de angiogénesis tumoral, TNF- α , receptor de TRAIL (R1 y R2), VEGFR, RANTES, T101, antígenos de células madre cancerígenas, factores de complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, y un producto oncogénico.
- 5 11. Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para usar en el tratamiento contra el cáncer.
- 10 12. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1
 Eficacia terapéutica de los inmunocombinados de MAb-CL2A-SN38 en ratones portadores del tumor Capan-1
 (250 µg dos veces por semana, durante 4 semanas), n = 9-10

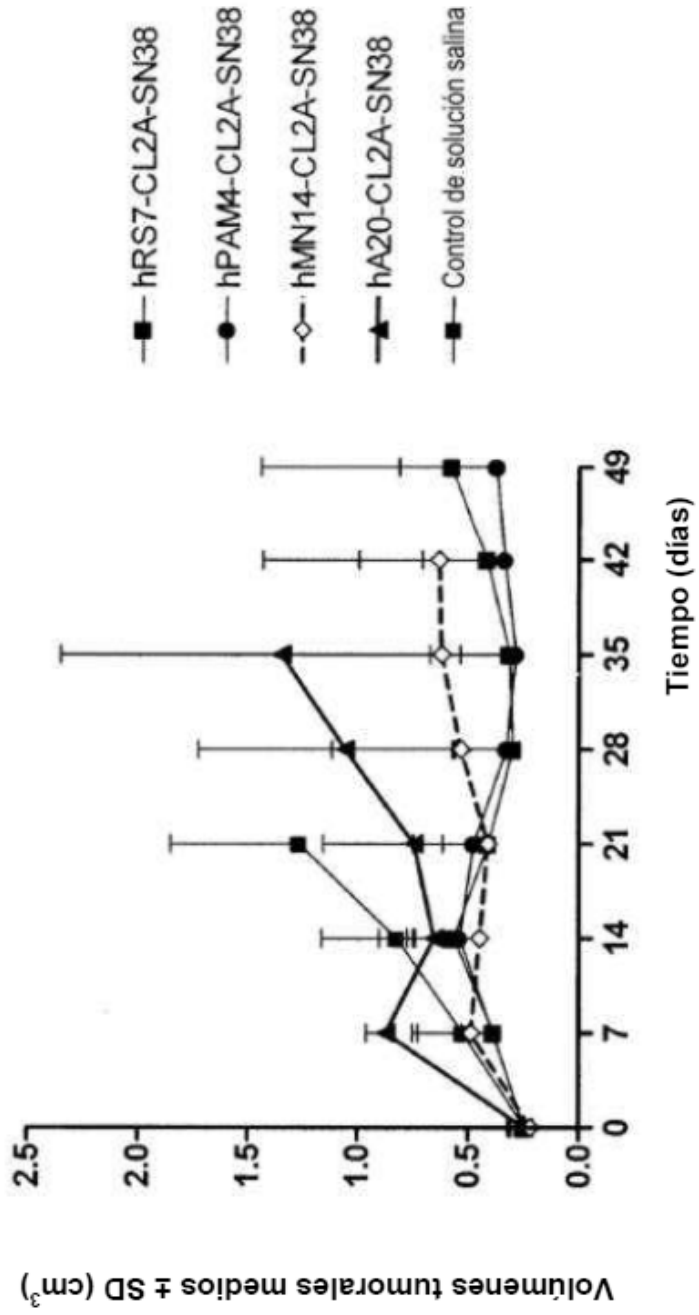


Figura 2
 Eficacia terapéutica de los inmunocombinados de MAb-CL2A-SN38 en ratones portadores de xenoinjerto de adenocarcinoma pancreático humano (BxPC-3) (500 µg dos veces por semana, durante 4 semanas), n = 10

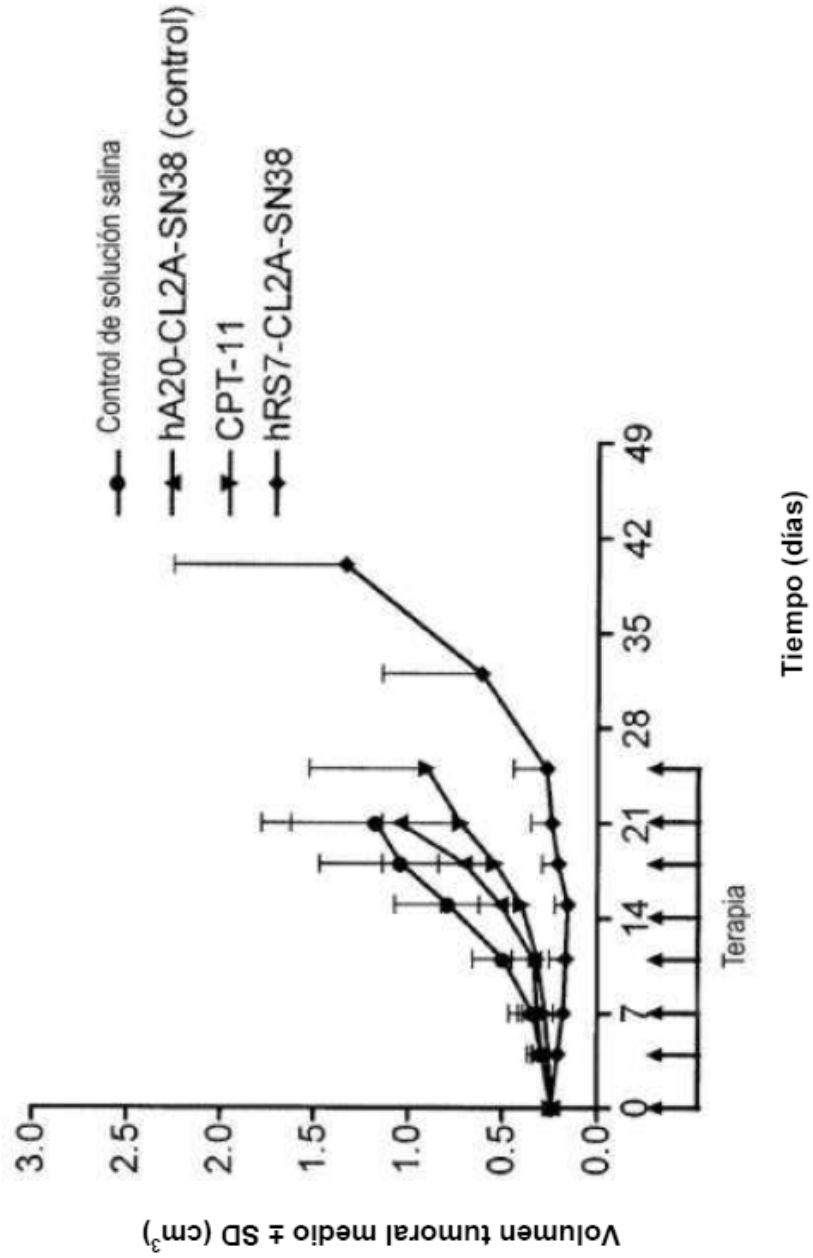


Figura 3
Eficacia terapéutica de hMN-14-CL2A-SN38 en el cáncer colorrectal humano experimental (LS 174T)
 (500 mg, i.p., dos veces por semana, durante 2 semanas), n = 10

