

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 698**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2009** **PCT/US2009/033182**
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2009** **WO09100194**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2009** **E 09707839 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024** **EP 2271359**

54 Título: **Conjugados de fracciones de unión a la camptotecina**

30 Prioridad:

06.02.2008 US 26811

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 988 698 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjugados de fracciones de unión a la camptotecina

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un conjugado de un fármaco de camptotecina (CPT) y una fracción de direccionamiento para su uso en el tratamiento del cáncer, y a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende el conjugado y una o más de otras modalidades terapéuticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Durante muchos años el uso de anticuerpos monoclonales (MAbs) para la administración específica de agentes tóxicos en cánceres humanos ha sido el objetivo de los científicos en el campo de la terapia farmacéutica específicamente dirigida. Se han desarrollado conjugados de MAbs asociados a tumores y agentes tóxicos adecuados, pero han tenido un éxito desigual en la terapia del cáncer y virtualmente ninguna aplicación en otras enfermedades, como las enfermedades infecciosas y autoinmunes. El agente tóxico es más comúnmente un fármaco quimioterapéutico, aunque también se han conjugado con MAbs radionucleidos emisores de partículas o toxinas bacterianas o vegetales, especialmente para la terapia del cáncer (Sharkey y Goldenberg, CA Cancer J Clin. julio-agosto 2006;56(4):226-243) y, más recientemente, con radioinmunoconjugados para la terapia preclínica de ciertas enfermedades infecciosas (Dadachova y Casadevall, Q J Nucl Med Mol Imaging 2006;50(3): 193-204).

Las ventajas de usar conjugados MAb-fármaco quimioterapéutico son que (a) el propio fármaco quimioterapéutico está estructuralmente bien definido; (b) el fármaco quimioterapéutico se enlaza a la proteína MAB usando productos químicos de conjugación muy bien definidos, a menudo en sitios específicos alejados de las regiones de unión al antígeno de los MAbs; (c) los conjugados MAB-fármaco quimioterapéutico pueden elaborarse de forma más reproducible que los conjugados químicos que implican MAbs y toxinas bacterianas o vegetales, y como tales son más susceptibles de desarrollo comercial y aprobación reglamentaria; y (d) los conjugados MAB-fármaco quimioterapéutico son órdenes de magnitud menos tóxicos sistémicamente que los conjugados de MAB radionucleidos.

La presente divulgación resuelve problemas específicos asociados con la preparación de conjugados del grupo de las camptotecinas (CPT) de compuestos citotóxicos. Las CPT y sus derivados son una clase de potentes agentes antitumorales. El irinotecán (también denominado CPT-11) y el topotecán son análogos de la CPT que están aprobados como agentes terapéuticos contra el cáncer (Iyer y Ratain, Cancer Chemother. Pharmacol. 42: S31-S43 (1998)). Las CPT actúan inhibiendo la enzima topoisomerasa I mediante la estabilización del complejo topoisomerasa I-ADN (Liu, et al. en The Camptothecins: Unfolding Their Anticancer Potential, Liehr J.G., Giovanella, B.C. y Verschraegen (eds), NY Acad Sci., NY 922:1-10 (2000)).

Las CPT presentan un conjunto de advertencias en la preparación de conjugados. Una advertencia es la insolubilidad de la mayoría de los derivados de CPT en tampones acuosos. En segundo lugar, las CPT plantean problemas específicos de modificación estructural para su conjugación con macromoléculas. Por ejemplo, la propia CPT sólo contiene un grupo hidroxilo terciario en el anillo E. El grupo funcional hidroxilo en el caso de la CPT debe acoplarse a un conector adecuado para la posterior conjugación de proteínas; y en los derivados potentes de la CPT, como el SN-38, el metabolito activo del CPT-11 quimioterapéutico, y otros derivados que contienen C-10-hidroxilo como el topotecán y el 10-hidroxi-CPT, la presencia de hidroxilo fenólico en la posición C-10 complica la necesaria derivatización de C-20-hidroxilo. En tercer lugar, la labilidad de la fracción de δ -lactona del anillo E de sus estructuras, en condiciones fisiológicas, da como resultado en una potencia antitumoral reducida en gran medida de estos productos. Por lo tanto, el protocolo de conjugación se realiza de tal manera que se lleve a cabo a un pH de 7 o inferior para evitar la apertura del anillo de lactona. Típicamente, la conjugación de una CPT bifuncional que posea un grupo amino-reactivo como un éster activo requeriría un pH de 8 o más. En cuarto lugar, debe incorporarse una fracción intracelularmente escindible en el conector/espaciador que conecta las CPT y los anticuerpos u otras fracciones de unión.

El problema de la apertura de la δ -lactona en condiciones fisiológicas ya se ha abordado con anterioridad. Un enfoque ha consistido en acilar el grupo hidroxilo C-20 con un aminoácido y acoplar el grupo α -amino del aminoácido al ácido poli-L-glutámico (Singer et al. en The Camptothecins: Unfolding Their Anticancer Potential, Liehr J.G., Giovanella, B.C. y Verschraegen (eds), NY Acad Sci., NY 922:136-150 (2000)). Este enfoque se basa en la difusión pasiva de una molécula polimérica en las zonas tumorales. Esta conjugación con glicina también se ha informado como un método para elaborar un derivado hidrosoluble de CPT (Vishnuvajjala et al., Patente de Estados Unidos N° 4,943,579) y en la preparación de una derivatización por PEG de CPT (Greenwald, et al. J. Med. Chem. 39: 1938-1940 (1996)). En el último caso, el enfoque se ha ideado en el contexto del desarrollo de formas hidrosolubles y de acción prolongada de CPT, mediante las cuales se aumenta la vida media *in vivo* de la CPT, y el fármaco se libera gradualmente de su conjugado mientras está en circulación *in vivo*.

Se divulgan métodos para preparar conjugados de CPT, de derivados 10-hidroxi como SN-38 en particular, teniendo en cuenta las cuatro advertencias descritas anteriormente y los desafíos sintéticos. El SN-38 es la forma farmacéutica activa del fármaco oncológico aprobado CPT-11, que es un profármaco. Hay disponibles numerosos datos clínicos referentes a la farmacología de la CPT-11 y su conversión *in vivo* en SN-38 (Iyer y Ratain, *supra*; 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 aproximadamente de 2 a 3 órdenes de magnitud más potente que la CPT-11.

Los primeros trabajos sobre conjugados proteína-fármaco indicaban que idealmente es necesario que un fármaco se libere en su forma original, una vez que se ha internalizado en una célula diana, para que el conjugado proteína-fármaco de quimioterapia fuese un agente terapéuticamente útil. Trouet et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:626-629 (1982)) mostraron la ventaja de usar enlaces peptídicos específicos, entre el fármaco y la fracción de direccionamiento, que se escinden lisosómicamente para liberar el fármaco intacto. Los trabajos de los años 80 y principios de los 90 se centraron en la naturaleza del conector químico entre el fármaco quimioterapéutico y el MAb. En particular, se desarrollaron conjugados MAb-fármaco quimioterapéutico preparados usando conectores escindibles por ácidos suaves, basándose en la observación de que el pH en el interior de los tumores era a menudo inferior al pH fisiológico normal. A este respecto, se obtuvieron resultados superiores incorporando una hidrazona como unidad escindible y uniendo el DOX a un MAb a través de un grupo tioéter, (Willner et al., Patente de Estados Unidos 5,708,146; Trail et al. (Science 261:212-215 (1993))).

Este enfoque demostró que los conjugados MAb-doxorrubicina (DOX), preparados con los conectores adecuados, podrían usarse para curar ratones portadores de una variedad de xenoinjertos tumorales humanos, en estudios preclínicos. El primer conjugado MAb-fármaco aprobado, Gemtuzumab Ozogamicin, incorpora un enlace de hidrazona ácido-lábil similar entre un anticuerpo anti-CD33, humanizado P67.6, y un derivado de caliqueamicina potente. Sievers et al., J Clin Oncol. 19:3244-3254 (2001); Hamann et al., Bioconjugate Chem. 13: 47-58 (2002). En algunos casos, los conjugados MAb-fármaco quimioterapéutico se hicieron con enlaces disulfuro impedidos reductivamente lábiles entre los fármacos quimioterapéuticos y el MAb (Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA 93: 8618-8623 (1996)). Otro conector escindible implica un espaciador dipéptido lábil a la catepsina B, como Phe-Lys o Val-Cit, similar a los espaciadores péptidos lisosomalmente lábiles de Trouet *et al.* que contienen de uno a cuatro aminoácidos, que adicionalmente incorporan un espaciador colapsable entre el fármaco y el dipéptido (Dubowchik, et al., Bioconjugate Chem. 13:855-869 (2002); Firestone et al., Patente de Estados Unidos 6,214,345 B1; Doronina et al., Nat Biotechnol. 21: 778-784 (2003)). Estos últimos enfoques también se utilizaron en la preparación de un inmunconjugado de camptotecina (Walker et al., Bioorg Med Chem Lett. 72:217-219 (2002)). Otra fracción escindible que se ha explorado es un enlace éster incorporado en el conector entre el anticuerpo y el fármaco quimioterapéutico. Gillimard y Saragovi descubrieron que cuando se conjugaba un éster de paclitaxel con un MAb p75 antirrata, MC192, o un MAb TrkA antihumano, 5C3, se observaba que el conjugado presentaba una toxicidad específica de la diana. Gillimard y Saragovi, Cancer Res. 61:694-699 (2001).

Aunque no puede exagerarse la importancia del conector escindible en el diseño de conjugados de fracción de unión-fármaco, también es importante centrarse en cómo afecta el diseño del conector a la preparación general de conjugados específicos de fracción de unión a CPT. La presente divulgación resuelve el problema asociado con la preparación de la molécula conector-fármaco bifuncional, en donde dicho fármaco también puede contener más de un grupo reactivo para derivatización, como el análogo potente SN-38, por ejemplo, en el diseño de conjugados. SN-38, una forma farmacéutica activa clínicamente importante del fármaco contra el cáncer CPT-11, pero 100-1000 veces más potente que CPT-11, no es utilizable sistémicamente debido a su insolubilidad. De acuerdo con la presente invención, como se define en las reivindicaciones, este problema se resuelve conjugándolo con una fracción de direccionamiento de tal manera que también se abordan otros desafíos del uso de una CPT, a la vez que se mejora el índice terapéutico de este fármaco clínicamente potente importante mediante el uso de anticuerpos específicos de la enfermedad.

Los conjugados de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, poseen una mayor eficacia, en muchos casos, que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos no conjugados o "desnudos", aunque dichas fracciones de direccionamiento no conjugadas se han usado en situaciones específicas. En el cáncer, por ejemplo, los anticuerpos desnudos han llegado a desempeñar un papel en el tratamiento de linfomas (CAMPATH® y RITUXAN®), cáncer colorrectal y otros tipos de cáncer (ERBITUX® y AVASTIN®), cáncer de mama (HERECEPTIN®), así como un gran número de ellos actualmente en desarrollo clínico (por ejemplo, epratuzumab). En la mayoría de estos casos, el uso clínico ha implicado combinar estos anticuerpos desnudos, o no conjugados, con otras terapias, como la quimioterapia o la radioterapia.

También se usan una variedad de anticuerpos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y otras enfermedades de desregulación inmunitaria, como los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral (TNF) y los anticuerpos contra las células B (RITUXAN®) en la artritis, y se están investigando en otras enfermedades de este tipo, como los anticuerpos de células B, RITUXAN® y epratuzumab, en el lupus eritematoso sistémico y el síndrome de Sjögren, así como en la diabetes juvenil y la esclerosis múltiple. También se están estudiando los anticuerpos desnudos en la sepsis 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 resumen los patógenos prioritarios contra los que se ha perseguido la terapia con anticuerpos desnudos, con el resultado de sólo 2 patógenos contra los que los anticuerpos están en ensayos clínicos de Fase III o se están comercializando (virus respiratorio sincitial y *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina), con otros 25 en estudios clínicos y 20 interrumpidos durante el estudio clínico.

Por tanto, hay una necesidad de desarrollar anticuerpos antipatógenos más potentes y otras fracciones de unión. Tales agentes terapéuticos mediados por anticuerpos pueden desarrollarse para el tratamiento de muchos patógenos diferentes, incluyendo bacterias, hongos, virus y parásitos, ya sea desnudos (no conjugados), radiomarcados o conjugados de fármaco/toxina. En el caso de la administración de conjugados de fármaco/toxina o radionúclido, esto puede lograrse mediante la conjugación directa de anticuerpos o por métodos indirectos, denominados predireccionamiento, en los que se usa un anticuerpo biespecífico para dirigirse a la lesión, mientras que el agente terapéutico se dirige secundariamente mediante la unión a uno de los brazos del anticuerpo biespecífico que se ha localizado en el sitio del patógeno o del cáncer o cualquier lesión que se esté tratando (analizado por Goldenberg et al., J Clin Oncol. febrero 2006 10;24(5):823-34.; y Goldenberg et al., J Nucl Med. enero 2008;49(1):158-63.

Los documentos WO 2004/054622 A1 y WO 2007/112193 A2 se refieren a conjugados terapéuticos con capacidad mejorada para dirigirse a varias células cancerígenas que contienen una fracción de direccionamiento y una fracción terapéutica, en donde las fracciones de direccionamiento y terapéutica están enlazadas mediante un conector.

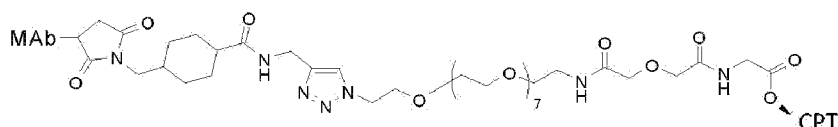
Walker MA et al. (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12 (2002) 217-219) informan sobre la síntesis de un inmunoconjugado de Camptotecina.

El documento WO 2007/018431 A2 se refiere a un compuesto que comprende una o más fracciones terapéuticas y/o de diagnóstico y una o más fracciones funcionales enlazadas entre sí mediante uno o más conectores que contienen triazol y a sus productos intermedios, en donde el conector que contiene triazol puede contener opcionalmente una o más fracciones condicionalmente escindibles o condicionalmente transformables y uno o más sistemas espaciadores entre dicha fracción o fracciones y la fracción terapéutica y/o de diagnóstico.

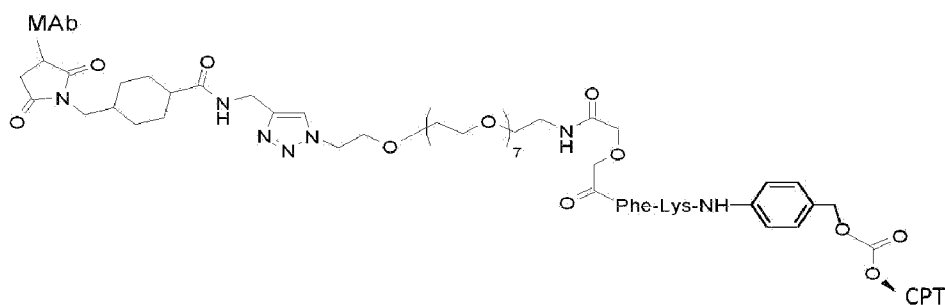
SUMARIO DE LA INVENCIÓN

El problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas; las realizaciones preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

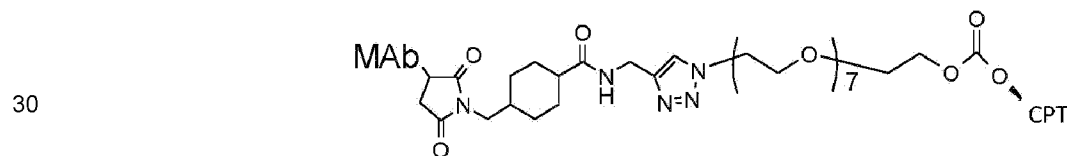
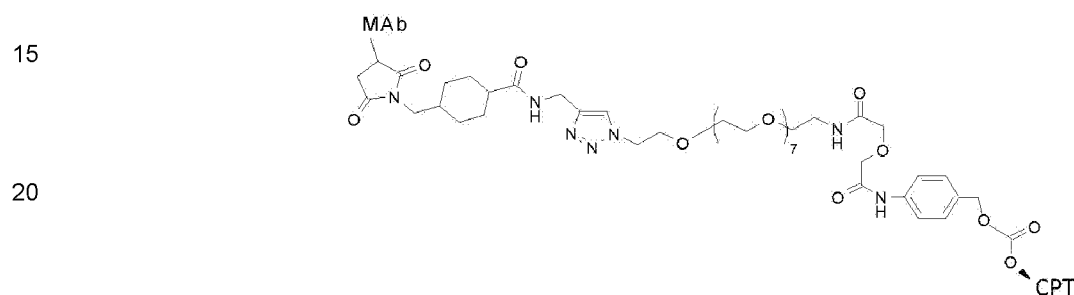
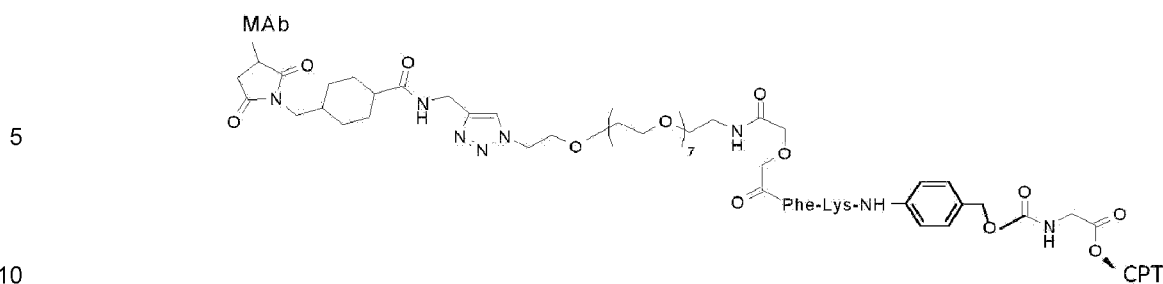
Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un primer aspecto mediante un conjugado de un fármaco de camptotecina (CPT) y una fracción de direccionamiento, en donde el conjugado tiene una fórmula estructural seleccionada del grupo que consiste en MAb-CL1-CPT, MAb-CL2-CPT, MAb-CL3-CPT, MAb-CL4-CPT y MAb-CL5-CPT y tiene una estructura seleccionada de:



MAb-CL1-CPT



MAb-CL2-CPT



MAb-CL5-CPT en donde el fármaco de CPT se selecciona del grupo que consiste en camptotecina, 10-hidroxi camptotecina, SN-38, topotecán, lurtotecán, 9- aminocamptotecina y 9-nitrocamptotecina; en donde el conector está unido al grupo 20-hidroxilo del fármaco de CPT; y en donde el MAb es un anticuerpo monoclonal (MAb) murino, quimérico, primatizado, humanizado o humano, y dicho anticuerpo está intacto, en forma de fragmento (Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂), o subfragmento (construido de cadena sencilla), para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización del primer aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un antígeno expresado por o asociado a un cáncer.

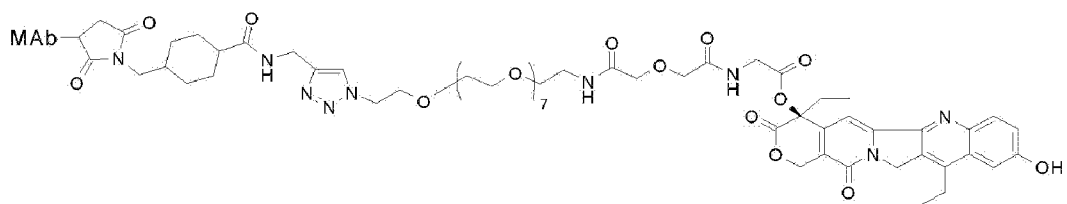
En una realización del primer aspecto, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer testicular, leucemia mieloide, linfomas de células B, leucemias de células B, leucemia linfocítica crónica, linfomas de células T, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, mieloma múltiple, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer renal, glioblastoma multiforme, histiocitoma, leucemia mieloide, adenocarcinomas, sarcomas, tumores gliales y carcinoma hepatocelular.

En una realización del primer aspecto, en donde dicho MAb se selecciona del grupo que consiste en LL1, LL2, RFB4, hA20, 1F5, L243, RS7, PAM-4, MN-3, MN-14, MN- 15, Mu-9, AFP-31, L19, G250, J591, CC49, L243, e Immu-31.

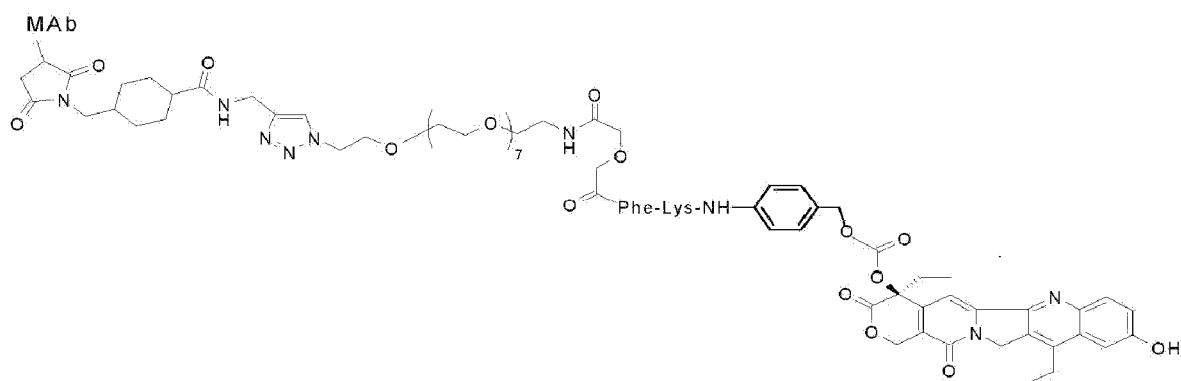
En una realización del primer aspecto, dicho conector se selecciona del grupo que consiste en CL1, CL2, CL3, CL4 y CL5.

En una realización del primer aspecto, dicho CPT es SN-38.

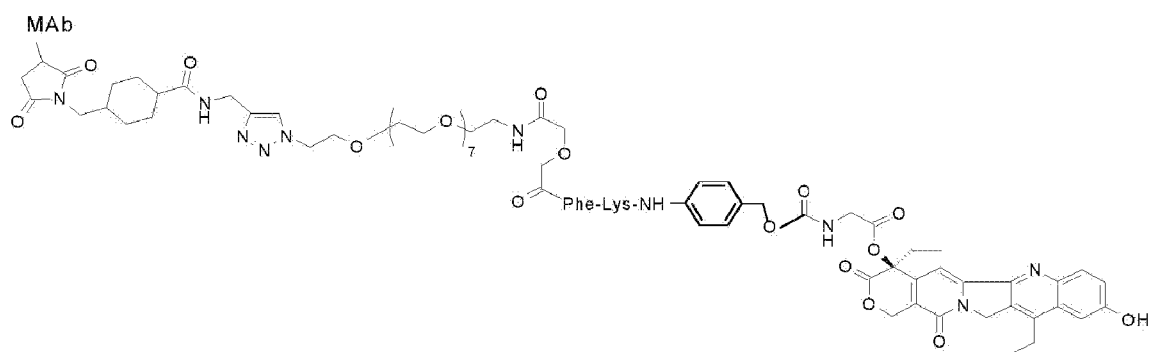
En una realización del primer aspecto, el conjugado tiene una fórmula estructural seleccionada del grupo que consiste en MAb-CL1-SN-38, MAb-CL2-SN-38, MAb-CL3-SN-38, MAb-CL4-SN-38, MAb-CL5-SN-38 y que tiene una estructura seleccionada de:



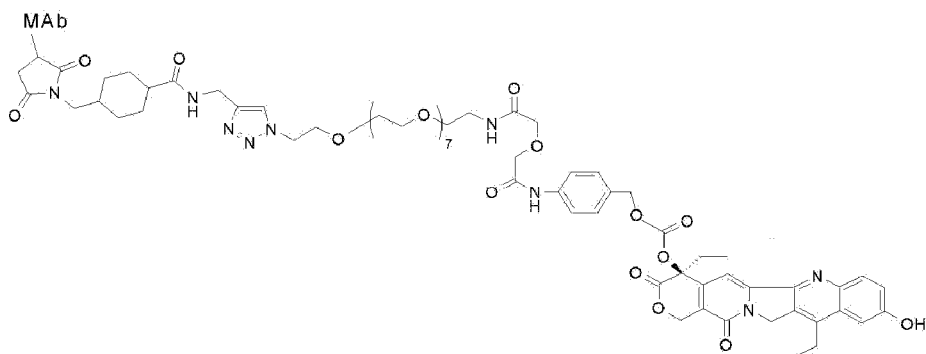
MAb-CL1-SN-38



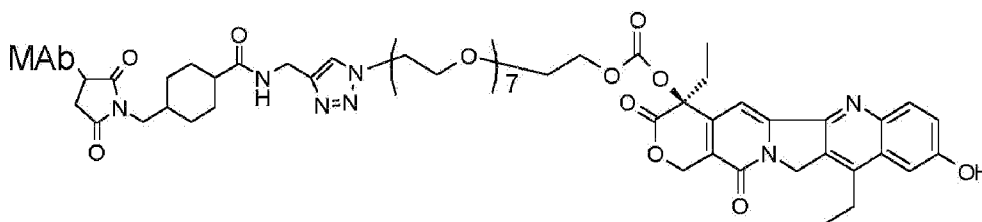
MAb-CL2-SN-38



MAb-CL3-SN-38



MAb-CL4-SN-38, o



MAb-CL5-SN-38.

En una realización del primer aspecto, la posición 10-hidroxi de SN-38 se protege como derivado de 10-O-éster o 10-O-carbonato usando una fracción "COR" donde el grupo R se selecciona de un residuo alquilo sustituido como "N(CH₃)₂-(CH₂)_n-" donde n es 2-10 y en donde el grupo amino terminal está opcionalmente en forma de una sal cuaternaria para mejorar la solubilidad acuosa, o residuos de alquilo simples como "CH₃-(CH₂)_n-" donde n es 0-10, o residuos alcoxi como "CH₃-(CH₂)_n-O-" donde n es 0-10 o "N(CH₃)₂-(CH₂)_n-O-" donde n es 2-10, o "R₁O-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₂-CH₂-O-" donde R₁ es etilo o metilo y n es un número entero con valores de 0-10.

En una realización del primer aspecto, dicho MAb se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD74, CD22, glicoproteína epitelial 1, antígeno carcinoembrionario (CEA o CD66e), antígeno p específico de colon, alfa-fetoproteína, CC49, antígeno de membrana específico de la próstata, anhidrasa carbónica IX, HER-2/neu, EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, ILGF, BrE3, CD19, CD20, CD21, CD23, CD33, CD45, CD74, CD80, CEACAM5, CEACAM6, VEGF, fibronectina ED-B, PIGF, un antígeno de angiogénesis tumoral, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, gangliósidos, HCG, EGP-2, CD37, HLA-DR, CD30, Ia, A3, A33, Ep-CAM, KS-I, Le(y), S100, PSA, tenascina, receptor de folato, antígenos Thomas- Friedreich, antígenos de necrosis tumoral, Ga 733, IL-2, IL-6, TI01, MAGE, factor de inhibición de la migración (MIF), un antígeno unido por L243, un antígeno unido por PAM4, CD66a (BGP), CD66b (CGM6), CD66c (NCA), CD66d (CGMI), TAC y combinaciones de los mismos.

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

En una realización del primer aspecto, el MAb es una proteína de fusión.

El problema subyacente a la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la composición comprende un conjugado de acuerdo con el primer aspecto y una o más modalidades terapéuticas seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos no conjugados, anticuerpos radiomarcados, anticuerpos conjugados con fármacos, anticuerpos conjugados con toxinas, terapia génica, quimioterapia, péptidos terapéuticos, oligonucleótidos, radioterapia localizada, cirugía y terapia de ARN de interferencia.

La presente invención, como se define en las reivindicaciones, resuelve una necesidad no satisfecha en la técnica. Los métodos y composiciones divulgados son de utilidad para el tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones que son refractarias o responden menos a otras formas de terapia, y pueden incluir enfermedades contra las que se pueden desarrollar, o están disponibles o se conocen, fracciones de direccionamiento (unión) adecuadas para el direccionamiento selectivo. Preferiblemente, la fracción de direccionamiento es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico u otro anticuerpo multivalente, u otra molécula o compuesto basado en anticuerpos. El anticuerpo puede ser de varios isotipos, preferiblemente IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4 e IgA, y puede ser un MAb humano-ratón quimérico, un humano-primate quimérico, un humanizado (marco humano y regiones hipervariables (CDR) murinas) o totalmente humanos, así como variaciones de los mismos, como anticuerpos medio IgG4, denominados "Unicuerpos", como describen van der Neut Kofschoten et al. (Science 2007; 317:1554-1557). Sin embargo, pueden usarse otras fracciones de unión conocidas en la técnica, como aptámeros, avímeros o péptidos de direccionamiento. Las enfermedades o afecciones ejemplares contra las que existen dichas fracciones de direccionamiento son, por ejemplo, el cáncer, las afecciones de desregulación inmunitaria, incluyendo las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias, y las enfermedades provocadas por organismos infecciosos.

Por tanto, los métodos y composiciones divulgados pueden aplicarse para el tratamiento de enfermedades y afecciones en las que se usan fracciones de direccionamiento para administrar agentes citotóxicos relacionados con la camptotecina. Tales enfermedades o afecciones pueden caracterizarse por la presencia de una molécula diana o célula diana que no se ve suficientemente afectada cuando se usan fracciones de direccionamiento no conjugadas o desnudas, como en la inmunoterapia del cáncer o de la infección por organismos patógenos. (Para métodos de elaboración de inmunconjugados de anticuerpos con isótopos, fármacos y toxinas para su uso en terapias de enfermedades, véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 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; 6,653,104; 6,962,702; y las Publicaciones de Solicitud de

Patente de Estados Unidos N° 20050191239; 20050175582; 20050136001; 20040166115; 20040043030; 20040022725; 20030068322; 20030031669; 20030026764 y 20020136690).

En ciertos ejemplos de la presente divulgación, pueden usarse conjugados de camptotecina de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos para dirigir este fármaco terapéutico a patógenos, como bacterias, virus, hongos y parásitos. En realizaciones preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones, las fracciones de direccionamiento conjugadas con el fármaco pueden usarse en combinación con otras modalidades terapéuticas, como fármacos antifúngicos, antibióticos y antivirales y/o anticuerpos desnudos, inmunomoduladores (por ejemplo, interferón, interleucinas y/u otras citoquinas). El uso de radioinmunoterapia para el tratamiento de organismos infecciosos se divulga, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 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 la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020136690 y 20030103982.

En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, los conjugados de camptotecina pueden usarse en combinación con cirugía, radiación, quimioterapia, inmunoterapia con anticuerpos desnudos, radioinmunoterapia, inmunomoduladores, vacunas y similares. En el tratamiento de otras enfermedades susceptibles de ser tratadas con fracciones de direccionamiento, como las enfermedades autoinmunes, pueden usarse combinaciones similares. Por ejemplo, los conjugados de camptotecina pueden combinarse con inhibidores del TNF, anticuerpos de células B, interferones, interleucinas y otros agentes eficaces para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, vasculitis, así como diabetes de tipo I (diabetes juvenil). Estas terapias combinadas pueden permitir la administración de dosis más bajas de cada agente terapéutico, reduciendo por tanto ciertos efectos secundarios graves y, reduciendo potencialmente, los ciclos terapéuticos necesarios. En las enfermedades víricas, estos inmunoconjugados farmacéuticos pueden combinarse con otros fármacos terapéuticos, inmunomoduladores, MAb's desnudos o vacunas (por ejemplo, MAb's contra los virus de la hepatitis, el VIH o el papiloma, o vacunas basadas en inmunógenos de estos virus). En la técnica, se conocen los anticuerpos y las vacunas basadas en antígenos contra estos y otros patógenos víricos y, en algunos casos, ya se usan comercialmente.

La presente divulgación se refiere a un proceso de preparación de conjugados, en donde un fármaco de CPT se derivatiza primero con un conector, dicho conector contiene una fracción reactiva capaz de combinarse con un segundo conector que contiene además un grupo de acoplamiento de fracción de direccionamiento; en donde el primer conector también posee una fracción definida de polietilenglicol (PEG) para la hidrosolubilidad y, opcionalmente, una fracción escindible intracelularmente que puede escindirse por peptidasas intracelulares o escindible por el entorno de bajo pH de las vesículas endosómicas y lisosómica, y opcionalmente un espaciador de aminoácidos entre dicho fármaco y el primer conector; en donde el segundo conector contiene un grupo reactivo capaz de reaccionar con el conjugado fármaco-(primer conector) mediante la reacción de cicloadición acetileno-azida catalizada por iones de cobre (+1), denominada en la técnica "química de clic".

La presente divulgación también se refiere a un proceso de preparación de conjugados como se indica en el párrafo anterior, en donde el segundo conector tiene un único grupo de acoplamiento de la fracción de direccionamiento, pero múltiples grupos reactivos capaces de reaccionar con el conjugado fármaco-(primer conector), amplificando de este modo el número de moléculas de fármaco conjugadas con la fracción de direccionamiento.

Además, la presente divulgación se refiere a un proceso de preparación de conjugados, en donde el conector se conjuga primero con un fármaco CPT, produciendo de este modo un conjugado fármaco de CPT-conector; en donde dicha preparación de conjugado fármaco de CPT-conector implica la protección y desprotección selectiva del grupo hidroxilo C-10, manteniendo el enlace carbonato C-20 esencialmente intacto, en derivados de CPT que contienen un grupo hidroxilo C-10; en donde dicho conjugado fármaco-conector opcionalmente no está purificado; y en donde dicho conjugado fármaco-conector se conjuga posteriormente con un anticuerpo monoclonal o fragmento.

Otro aspecto más de la presente divulgación es un método para tratar una enfermedad autoinmune, una infección o una lesión infecciosa con los conjugados descritos en la presente. Los conjugados de fracción de direccionamiento de fármaco para su uso de acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones pueden elaborarse mediante los procesos divulgados y/o kits para realizar dichos procesos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar ciertos aspectos de realizaciones particulares de la invención. Las realizaciones pueden entenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada presentada en la presente.

FIG. 1. Estabilidad hidrolítica de los conjugados hMN-14-[SN38-CL'x'] ('x' = 1,2,3,4,5) y hMN-14-[EtO-CO-10-O-SN38-CL2] conjugates en PBS, pH 7,4, 37 °C.

FIG. 2. Unión celular de varios inmunoconjugados hMN14-SN38 en una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano LoVo.

FIG. 3. Citotoxicidad *in vitro* de varios inmunocombinados hMN14-SN38 en una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano LoVo.

FIG. 4. Citotoxicidad contra el adenocarcinoma de pulmón (Calu-3).

FIG. 5. Curvas de supervivencia de ratones tratados con hMN14-CL-SN38 con enfermedad metastásica pulmonar GW-39.

FIG. 6. Eficacia terapéutica de hPAM4-CL2-SN38 en ratones portadores de tumores CaPan1 (n = 4) (500 µg, q4dx8).

DEFINICIONES

A menos que se especifique lo contrario, "un" o "uno" significa "uno o más".

En la descripción que sigue, se usan una serie de términos y se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de la presente invención. Los términos que no se definen expresamente en la presente se usan de acuerdo con su significado llano y corriente.

El término "fracción de direccionamiento" como se usa en la presente se refiere a una molécula, complejo o agregado que se une específica o selectivamente a una molécula, célula, partícula, tejido o agregado diana. En las realizaciones preferidas, una fracción de direccionamiento es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico u otra molécula o compuesto a base de anticuerpos. Sin embargo, se conocen otros ejemplos de fracciones de direccionamiento en la técnica y pueden usarse, como aptámeros, avímeros, ligandos de unión a receptores, ácidos nucleicos, pares de unión biotina-avidina, péptidos o proteínas de unión, etc. Los términos "fracción de direccionamiento" y "fracción de unión" se usan en la presente como sinónimos.

Un anticuerpo, como se describe en la presente, se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, de origen natural o formada por procesos recombinatorios de fragmentos de genes de inmunoglobulina normales) (por ejemplo, un anticuerpo IgG) o una porción inmunológicamente activa (es decir, de unión específica) de una molécula de inmunoglobulina, como un fragmento de anticuerpo. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede conjugarse o derivatizarse de otro modo dentro del alcance de la materia reivindicada. Tales anticuerpos incluyen IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4 (y subformas de IgG4), así como isotipos de IgA.

Un fragmento de anticuerpo es una porción de un anticuerpo como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv (Fv de cadena sencilla) y similares, incluyendo las semimoléculas de IgG4 citadas anteriormente (van der Neut Kofschoten et al. (Science 2007; 317(14 Sept): 1554-1557). Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo de uso se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye cualquier proteína sintética o manipulada genéticamente que actúe como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados consistentes en las regiones variables, como los fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas recombinantes de cadena sencilla en las que las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un conector peptídico ("proteínas scFv"), y unidades de reconocimiento mínimo consistentes en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable, como las CDR. Los fragmentos Fv pueden construirse de diferentes maneras para producir formas de unión multivalentes y/o multispecíficas. En el primer caso de multivalentes, reaccionan con más de un sitio de unión contra el epítipo específico, mientras que con las formas multispecíficas, se une más de un epítipo (ya sea del mismo antígeno o contra el antígeno específico y un antígeno diferente). Como se usa en la presente, el término componente de anticuerpo incluye un anticuerpo completo, una proteína de fusión y fragmentos de los mismos.

Un anticuerpo desnudo es generalmente un anticuerpo completo que no está conjugado con un agente terapéutico. Esto es así porque la porción Fc de la molécula de anticuerpo proporciona funciones efectoras o inmunológicas, como la fijación del complemento y la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), que ponen en marcha mecanismos que pueden dar como resultado la lisis celular. Sin embargo, la porción Fc puede no ser necesaria para la función terapéutica del anticuerpo, sino que pueden entrar en juego otros mecanismos, como la apoptosis, la angiogénesis, la actividad antimetastásica, la actividad antiadhesión, como la inhibición de la adhesión heterotípica u homotípica, y la interferencia en las vías de señalización, e interferir en la progresión de la enfermedad. Los anticuerpos desnudos incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, y fragmentos de los mismos, que incluyen anticuerpos murinos, así como ciertos anticuerpos recombinantes, como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos y fragmentos de los mismos. Por lo tanto, en algunos casos un "anticuerpo desnudo" también puede referirse a un fragmento de anticuerpo "desnudo". Como se define en la presente, "desnudo" es sinónimo de "no conjugado", y significa no enlazado o conjugado a un agente terapéutico con el que se administra.

Las enfermedades autoinmunes son trastornos provocados por una respuesta inmunitaria del organismo contra sus propios tejidos. Los ejemplos incluyen las enfermedades autoinmunes de clase III, como las trombocitopenias inmunomediadas, la púrpura trombocitopénica idiopática aguda y la púrpura trombocitopénica idiopática crónica, la dermatomiositis, el síndrome de Sjögren, la esclerosis múltiple, la corea de Sydenham, la miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide

bulloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis postestreptocócica, eritema nodoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía de IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, síndrome de Sjogren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirototoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, artritis reumatoide, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, *pamphigus vulgaris*, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis/polimialgia de células gigantes, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva y alveolitis fibrosante, según se divulga en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de Serie 60/360,259, presentada el 1 de marzo de 2002.

Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante que contiene los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, incluyendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de una especie, preferiblemente un anticuerpo de roedor, más preferiblemente un anticuerpo murino, mientras que los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. Para aplicaciones veterinarias, los dominios constantes del anticuerpo quimérico pueden derivarse de los de otras especies, como un primate subhumano, un gato o un perro.

Un anticuerpo humanizado es una proteína recombinante en la que las CDR de un anticuerpo de una especie; por ejemplo, un anticuerpo de roedor, se transfieren de las cadenas variables pesadas y ligeras del anticuerpo de roedor a dominios variables pesados y ligeros humanos. Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. En algunos casos, residuos específicos de la región marco del anticuerpo humanizado, en particular los que están en contacto o cerca de las secuencias CDR, pueden modificarse, por ejemplo, sustituyéndose por los residuos correspondientes del anticuerpo original de roedor, primate subhumano u otro.

Un anticuerpo humano es un anticuerpo obtenido, por ejemplo, de ratones transgénicos que han sido "manipulados" para que produzcan anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición antigénica. En esta técnica, se introducen elementos del locus de las cadenas pesadas y ligeras humanas en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones específicas de los loci endógenos de las cadenas pesadas y ligeras. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de 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 completamente humano también puede construirse por métodos de transfección genética o cromosómica, así como por tecnología de presentación en fagos, todos ellos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990) para la producción de anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. En esta técnica, los genes de dominio variable de anticuerpos se clonan dentro del marco de un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, y se muestran como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Como la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos puede realizarse en una variedad de formatos, para su revisión, véase por ejemplo Johnson y Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:556-571 (1993). Los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante células B activadas *in vitro*. Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y 5.229.275.

Enfermedades infecciosas como se usan en la presente son enfermedades que implican una infección por patógenos como bacterias, rickettsias, micoplasmas, protozoos, hongos, virus, parásitos u otros agentes microbianos. Algunos ejemplos incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (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*, *Neumococo*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hernophilis 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 gripe, citomegalovirus, virus del herpes simple I, virus del herpes simple II, virus similar al parvo sérico humano, virus respiratorio sincitial, virus de varicela-zóster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del sarampión, adenovirus, virus de la leucemia humana de células T, virus de Epstein-Barr, virus de la leucemia murina, virus de las paperas, virus de la estomatitis vesicular, virus sindbis, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus de las verrugas, virus de la lengua azul, virus de Sendai, virus de la leucemia felina, virus reo, virus de la poliomiéltis, virus simio 40, virus del tumor mamario de ratón, virus del dengue, virus de la rubéola, *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*, *Mesocostoides corti*, *Mycoplasma arthritidis*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. salivarium* y *M. pneumoniae*. En Casadevall, *Clin Immunol* 1999; 93(1):5-15, se incluye una revisión que enumera los anticuerpos contra organismos infecciosos (anticuerpos antitoxina y antivirales), así como otras dianas.

Un agente terapéutico es una molécula o átomo que se administra por separado, concurrentemente o secuencialmente con una fracción de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o un subfragmento del mismo, y es útil en el tratamiento de una enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, conjugados, fármacos, agentes citotóxicos, agentes proapoptóticos, toxinas, nucleasas (incluyendo ADNsas y ARNsas), hormonas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes o colorantes fotoactivos, radioisótopos o radionucleidos, oligonucleótidos, ARN de interferencia, péptidos, agentes antiangiogénicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, quimiocinas, profármacos, enzimas, proteínas o péptidos de unión, conjugados o combinaciones de los mismos.

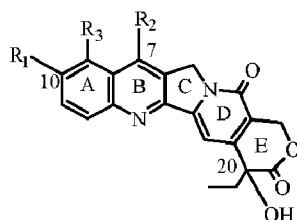
Un conjugado es un componente de anticuerpo u otra fracción de direccionamiento conjugado con un agente terapéutico. Los agentes terapéuticos adecuados se han descrito anteriormente.

Como se usa en la presente, el término proteína de fusión de anticuerpos es una molécula de unión a antígeno producida recombinantemente en la que se unen dos o más segmentos iguales o diferentes de anticuerpos naturales, anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpos con las mismas especificidades o unas diferentes. Una proteína de fusión comprende por lo menos un sitio de unión específico. La valencia de la proteína de fusión indica el número total de brazos o sitios de unión que tiene la proteína de fusión con el antígeno o antígenos o epítipo o epítopos; es decir, monovalente, bivalente, trivalente o multivalente. La multivalencia de la proteína de fusión de anticuerpos significa que puede aprovechar múltiples interacciones en la unión a un antígeno, aumentando por tanto la avidéz de unión al antígeno, o a diferentes antígenos. La especificidad indica a cuántos tipos diferentes de antígeno o epítipo es capaz de unirse una proteína de fusión de anticuerpos; es decir, monoespecífica, biespecífica, triespecífica, multiespecífica. Usando estas definiciones, un anticuerpo natural, por ejemplo, una IgG, es bivalente porque tiene dos brazos de unión, pero es monoespecífico porque se une a un solo tipo de antígeno o epítipo. Una proteína de fusión multivalente monoespecífica 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 de anticuerpos o múltiples copias del mismo componente de anticuerpos. La proteína de fusión puede contener además un agente terapéutico.

Un inmunomodulador es un agente terapéutico que, cuando está presente, altera, suprime o estimula el sistema inmunitario del organismo. Típicamente, un inmunomodulador de uso estimula las células inmunitarias para que proliferen o se activen en una cascada de respuesta inmunitaria, como macrófagos, células dendríticas, células B y/o células T. Sin embargo, en algunos casos un inmunomodulador puede suprimir la proliferación o activación de células inmunitarias, como en el tratamiento terapéutico de enfermedades autoinmunitarias. Un ejemplo de inmunomodulador descrito en la presente es una citoquina, que es una proteína pequeña soluble de aproximadamente 5-20 kDa liberada por una población celular (por ejemplo, linfocitos T cebados) al entrar en contacto con antígenos específicos, y que actúa como mediador intercelular entre células. Como comprenderán los expertos en la técnica, los ejemplos de citoquinas incluyen las linfoquinas, las monocinas, las interleucinas y varias moléculas de señalización relacionadas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y los interferones. Las quimiocinas son un subconjunto de las citoquinas. Algunas interleucinas e interferones son ejemplos de citoquinas que estimulan la proliferación de células T u otras células inmunitarias.

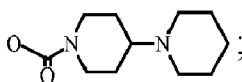
CPT es la abreviatura de camptotecina, y tal como se usa en la presente solicitud CPT representa la propia camptotecina o un análogo o derivado de la camptotecina. Las estructuras de la camptotecina y algunos de sus análogos, con la numeración indicada y los anillos etiquetados con las letras A-E, se dan en la fórmula 1 en el Cuadro 1 a continuación.

Cuadro 1



(1)

CPT: $R_1 = R_2 = R_3 = H$ 10-Hidroxi-CPT: $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$ CPT-11: $R_1 =$

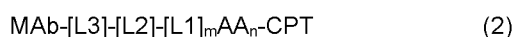


R₂ = etilo; R₃ = H SN-38: R₁ = OH; R₂ = etilo; R₃ = H Topotecan: R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = CH₂-N(CH₃)₂

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se han concebido los siguientes métodos para la preparación de conjugados de CPT o un análogo o derivado de CPT (colectivamente 'CPT') con una fracción de direccionamiento como un anticuerpo (MAb). (1) La solubilidad de la CPT se mejora colocando una fracción definida de polietilenglicol (PEG) entre la CPT y el vector de direccionamiento; (2) un primer conector conecta el fármaco en un extremo y termina con un grupo acetileno o un grupo azida o acetileno en el otro extremo; este primer conector comprende una fracción definida de PEG con un grupo azida o acetileno en un extremo y un grupo reactivo diferente, como un ácido carboxílico o un grupo hidroxilo, en el otro extremo, y dicho PEG definido bifuncional se une a una CPT-20-derivado de éster de un aminoácido o a CPT-20-O-cloroformiato; alternatively, la fracción no de azida (o acetileno) de dicho PEG bifuncional definido se une opcionalmente a un conector escindible, escindible por peptidasas intracelulares o por pH bajo en ciertos compartimentos intracelulares, y el conector escindible se une al fármaco; (3) un segundo conector, que comprende un grupo de acoplamiento de la fracción de direccionamiento y un grupo reactivo complementario al grupo azida (o acetileno) del primer conector, concretamente, acetileno (o azida), reacciona con el conjugado fármaco-(primer conector) mediante una reacción de cicloadición acetileno-azida para proporcionar el producto farmacéutico bifuncional final que es útil para conjugarse con las fracciones de direccionamiento de la enfermedad, como los anticuerpos de direccionamiento a la enfermedad; (4) el grupo de acoplamiento de anticuerpos está diseñado para que sea un tiol o un grupo reactivo al tiol; (5) se conciben métodos para la regeneración selectiva del grupo 10-hidroxilo en presencia del carbonato de C-20 en preparaciones de precursor de conector de fármaco que implican análogos de CPT como SN-38 y (6) el grupo 10-hidroxilo de los análogos de CPT se protege alternatively como un éster o carbonato, distinto del "BOC", de tal manera que la CPT bifuncional se conjuga con la fracción de direccionamiento sin desprotección previa de este grupo protector, y el grupo protector se desprotege fácilmente en condiciones de pH fisiológico después de que se haya administrado el bioconjugado. En el acoplamiento acetileno-azida, denominado en la técnica "química de clic", la parte de azida puede estar en L2 y la parte de acetileno en L3; alternatively, L2 puede contener acetileno y L3 azida. La "química del clic" es una reacción de cicloadición catalizada por cobre (+1) entre una fracción de acetileno y una fracción de azida, y es una técnica relativamente reciente en bioconjugaciones (Kolb HC y Sharpless KB, Drug Discov Today 2003; 8: 1128-37). La química de clic tiene lugar en solución acuosa en condiciones de pH casi neutro, por lo que es apta para la conjugación de fármacos. La ventaja de la química del clic es que es quimioselectiva y complementa otras químicas de conjugación bien conocidas, como la reacción tiol-maleimida. En el análisis siguiente, cuando un conjugado comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, puede sustituirse por otro tipo de fracción de unión, como un aptámero, avímero o péptido diana.

Una divulgación genérica se dirige a un conjugado de un derivado farmacéutico de la camptotecina y un anticuerpo de la fórmula general 2,



donde MAb es un anticuerpo de direccionamiento a la enfermedad; CPT es camptotecina (CPT) o un análogo de la misma; L-3 es un componente del reticulante que comprende una fracción de acoplamiento de anticuerpos y uno o más grupos acetileno (o azida); L2 comprende un PEG definido con azida (o acetileno) en un extremo, complementario a la fracción de acetileno (o azida) en el conector 3, y un grupo reactivo como un ácido carboxílico o un grupo hidroxilo en el otro extremo; L1 comprende un conector colapsable, o una fracción escindible por peptidasa opcionalmente unida a un conector colapsable, o una fracción escindible por ácido; AA es un aminoácido; m es un número entero con valores de 0 o 1, y n es un número entero con valores de 0, 1, 2, 3, o 4.

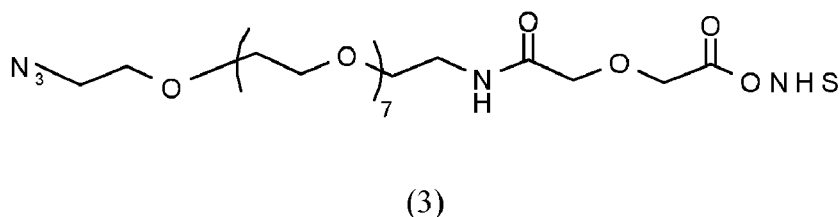
Si m es 0, se forma primero una fracción de éster entre el ácido carboxílico de un aminoácido como la glicina, la alanina o la sarcosina, o de un péptido como la glicilglicina, y el 20-hidroxilo de la CPT. En estos casos, el extremo N-terminal del aminoácido o polipéptido se protege como un derivado Boc o Fmoc o un monometoxitritilo (MMT), que se desprotege después de la formación de un enlace éster con el 20-hidroxilo de CPT. La eliminación selectiva del grupo protector amina, en presencia de un grupo protector BOC en la posición C-10-hidroxilo de los análogos de CPT que contienen el grupo 10-hidroxilo adicional, como en algunos análogos mostrados en el Cuadro 1, se consigue usando monometoxitritilo (MMT) como grupo protector del grupo amino del aminoácido o polipéptido implicado en la formación del éster, ya que el 'MMT' es eliminable mediante un tratamiento ácido suave como el ácido dicloroacético que no escinde un grupo BOC. Después de desenmascarar el grupo amino del aminoácido o polipéptido que forma un enlace éster con CPT en la posición 20, el grupo amino se hace reaccionar con la forma activada del grupo COOH en la fracción de PEG de L1 en condiciones estándar de formación de amida. L3 puede comprender un grupo reactivo a tiol que se une a los grupos tiol de dicha fracción de direccionamiento. El grupo reactivo a tiol es opcionalmente una maleimida o vinilsulfona, o bromoacetamida, o yodoacetamida, que se une a los grupos tiol de dicha fracción de direccionamiento. Ventajosamente, dicho reactivo con un grupo reactivo a tiol se genera a partir de succinimidil-4-(N maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) o a partir de succinimidil-(ε-maleimido)caproato, por ejemplo,

siendo el grupo reactivo a tiol un grupo maleimida.

Ventajosamente, m es 0, y AA comprende una fracción polipeptídica, preferiblemente tri o tetrapeptídica, que es escindible por una peptidasa intracelular como la catepsina-B. Ejemplos de péptidos escindibles por catepsina-B son: Phe-Lys, Val-Cit (Dubowchick, 2002), Ala-Leu, Leu-Ala-Leu, y Ala-Leu-Ala-Leu (Trouet et al., 1982).

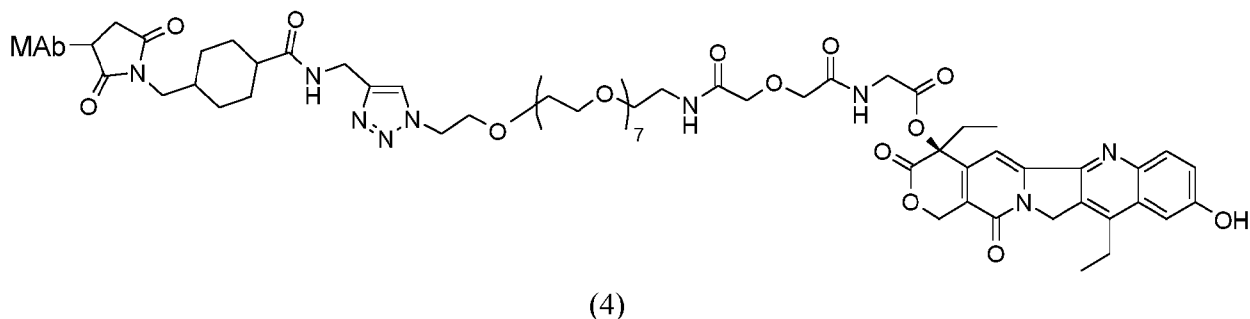
Ventajosamente, L1 se compone de un polipéptido que puede eliminarse intracelularmente, como un péptido que puede eliminarse con catepsina B, conectado al conector colapsable alcohol *p*-aminobencílico en el extremo C-terminal del péptido, cuya porción de alcohol bencílico está a su vez unida directamente al CPT-20-O-cloroformiato. En este caso, n es 0. Alternativamente, cuando " n " es distinto de cero, la porción de alcohol bencílico de la fracción del alcohol *p*-amidobencílico está unida al extremo N-terminal del aminoácido o polipéptido de enlace en la posición 20 de CPT a través de la forma activada del alcohol *p*-amidobencílico, concretamente PABOCOPNP donde PNP es *p*-nitrofenilo. Ventajosamente, el conector comprende un grupo reactivo a tiol que se une a grupos tiol de dicha fracción de direccionamiento. El grupo reactivo a tiol es opcionalmente una maleimida o vinilsulfona, o bromoacetamida, o yodoacetamida, que se une a los grupos tiol de dicha fracción de direccionamiento. Ventajosamente, dicho reactivo que lleva un grupo reactivo a tiol se genera a partir de succinimidil-4-(N maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) o a partir de succinimidil-(ϵ -maleimido)caproato, por ejemplo, el grupo reactivo a tiol siendo un grupo maleimida.

Ventajosamente, el componente L2 del conjugado contiene un espaciador de polietilenglicol (PEG) que puede tener un tamaño de hasta MW 5000, y en un ejemplo más ventajoso, el PEG es un PEG definido con (1-12 o 1-30) unidades de repetición monoméricas. En un ejemplo más ventajoso, el PEG es un PEG definido con 1-12 unidades de repetición monoméricas. La introducción de PEG puede implicar el uso de derivados de PEG heterobifuncionalizados que están disponibles comercialmente. En el contexto de la presente divulgación genérica, el PEG heterobifuncional contiene un grupo azida o acetileno. Un ejemplo de PEG heterobifuncional definido que contiene 8 unidades de repetición monoméricas, con 'NHS' siendo succinimidilo, se proporciona a continuación en la fórmula 3:

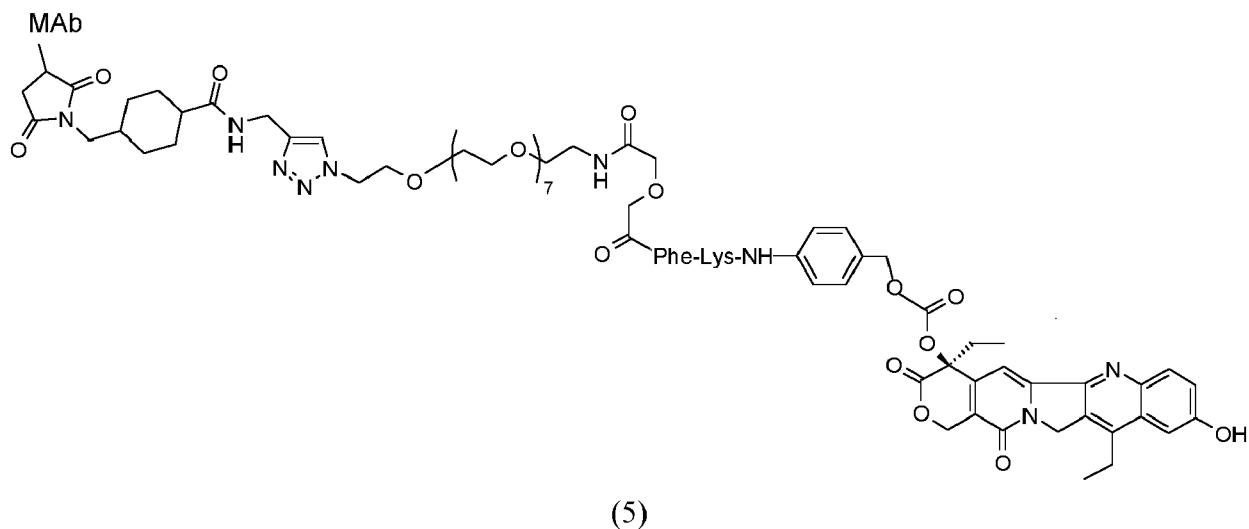


Ventajosamente, L3 tiene una pluralidad de grupos acetileno (o azida), que varían entre 2-40, pero preferiblemente entre 2-20, y más preferiblemente entre 2-5, y una única fracción de unión al vector de direccionamiento.

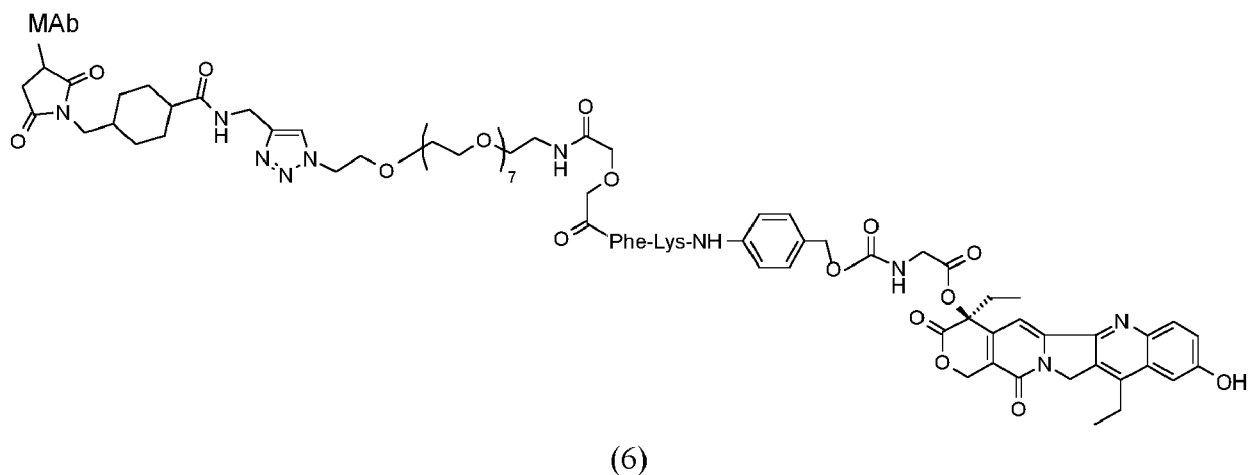
A continuación, se muestra un conjugado SN-38 representativo (un análogo de CPT) de un anticuerpo, preparado con un derivado de SN-38 que contiene maleimida, con la unión a MAb representada como una succinimida. Aquí, $m = 0$, y el éster 20-O-AA que se une a SN-38 es glicinato; el acoplamiento azida-acetileno que une las partes L2 y L3 de la fórmula 2 da como resultado la fracción de triazol como se muestra.



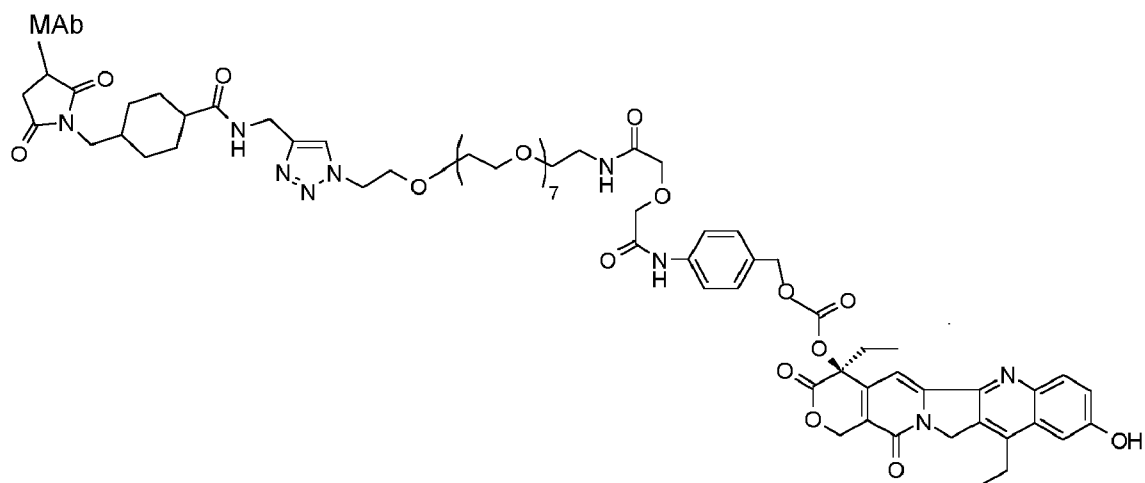
A continuación, se presenta un conjugado SN-38 representativo de un anticuerpo, preparado con un derivado del conector de SN-38 que contiene maleimida, con la unión a MAb representada como una succinimida. Aquí, $n = 0$ en la fórmula general 2; 'L1' contiene un dipéptido escindible con catepsina-B unido a la fracción de alcohol *p*-aminobencílico colapsable, y esta última está unida a SN-38 como una unión de carbonato en la posición 20; el acoplamiento de azida-acetileno que une las partes 'L2' y 'L3' de la fórmula 2 da como resultado la fracción de triazol como se muestra.



A continuación, se muestra un conjugado SN-38 representativo de un anticuerpo, preparado con un derivado del conector de SN-38 que contiene maleimida, con la unión al MAb representada como una succinimida. Aquí, el éster 20-O-AA que se une a SN-38 es glicinato que se une a la porción L1 a través de una fracción de alcohol *p*-aminobencílico y un dipéptido escindible con catepsina-B; este último se une a su vez a 'L2' a través de un enlace amida, mientras que las partes 'L2' y 'L3' de la fórmula general 2 se acoplan a través de 'química de clic' azida-acetileno, como se muestra.

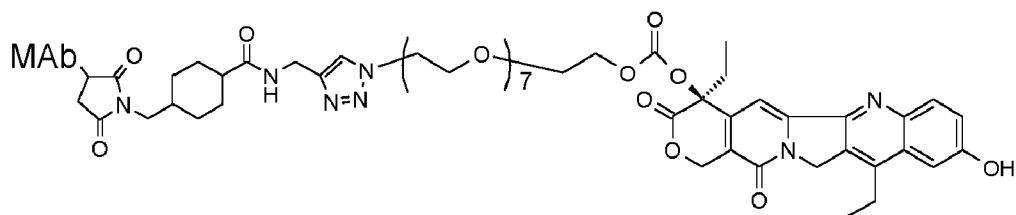


A continuación, se presenta un conjugado SN-38 representativo de un anticuerpo, preparado con un derivado del conector de SN-38 que contiene maleimida, con la unión al MAb representada como una succinimida. Aquí, $n = 0$ en la fórmula general 2; 'L1' contiene sólo la fracción de alcohol *p*-aminobencílico colapsable, y esta última está unida a SN-38 como una unión de carbonato en la posición 20; el acoplamiento de azida-acetileno que une las partes 'L2' y 'L3' de la fórmula 2 da como resultado la fracción de triazol como se muestra.



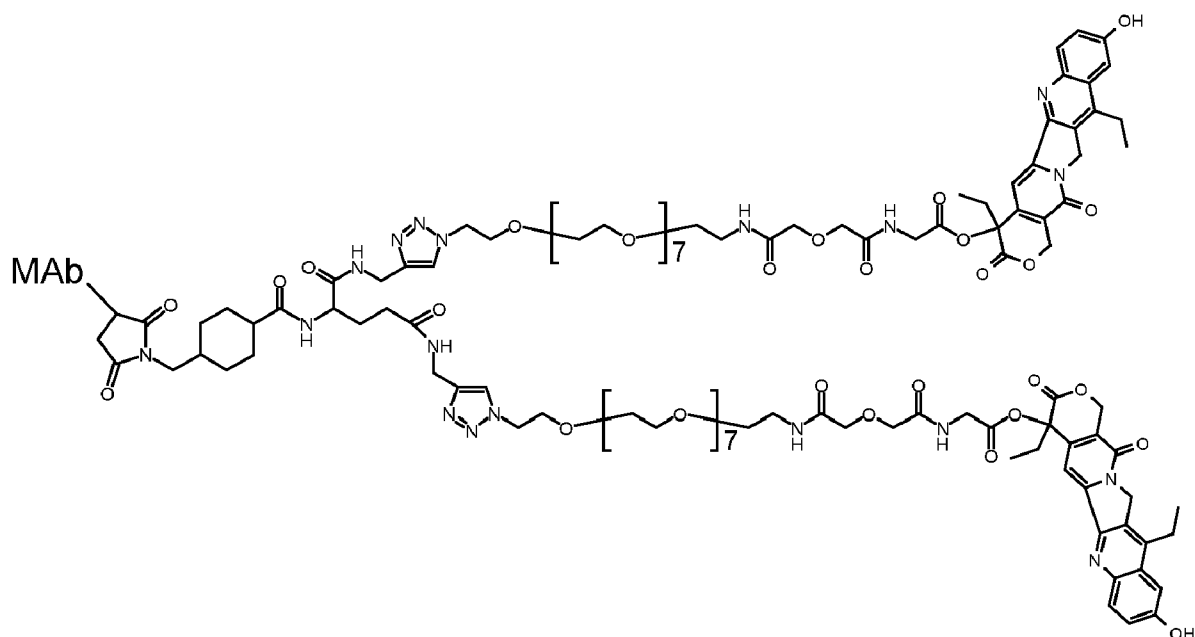
(7)

A continuación, se presenta un conjugado SN-38 representativo de un anticuerpo, preparado con un derivado del conector de SN-38 que contiene maleimida, con la unión a MAb representada como una succinimida. Aquí, $m = 0$, $n = 0$ en la fórmula general 2; 'L2' que contiene PEG azido se une a SN-38 como un enlace de carbonato en la posición 20; el acoplamiento de azido-acetileno que une las partes 'L2' y 'L3' de la fórmula 2 da como resultado la fracción de triazol como se muestra.



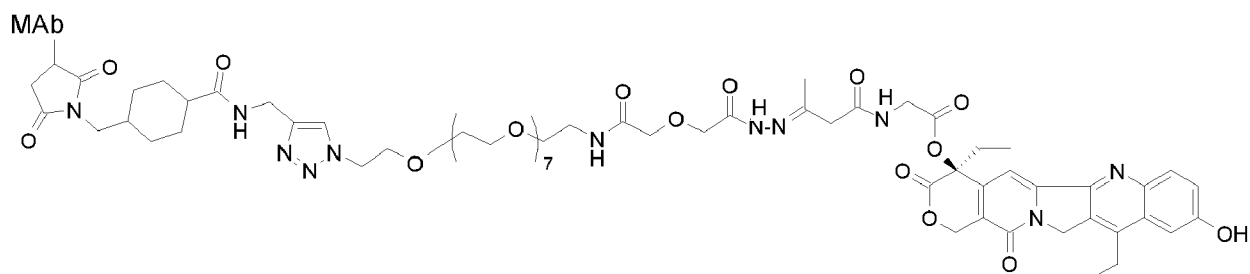
(8)

A continuación, se muestra un conjugado SN-38 representativo de un anticuerpo que contiene múltiples moléculas de fármaco y una única fracción de unión al vector de direccionamiento. El componente 'L3' de esta estructura se une a 2 grupos acetilénicos, lo que da como resultado la unión de dos moléculas de SN-38 unidas por azida. Aquí, $m = 0$, y el éster 20-O-AA que se une a SN-38 es glicinato; el acoplamiento azida-acetileno que une las partes L2 y L3 da como resultado una fracción de bis-triazol, como se muestra. La unión a MAb se representa como una succinimida.



(9)

A continuación, se muestra un conjugado SN-38 representativo de un anticuerpo, preparado con un derivado del conector de SN-38 que contiene maleimida, con la unión al MAb representada como una succinimida. Aquí, 'AA' es glicinato (es decir, SN-38-20-O-glicinato), que se hace reaccionar con un acetoacetato activado. En la porción L1, el ácido PEG se convierte en la hidrazida correspondiente y se une a SN38-20-O-glicinatoacetoacetato en forma de hidrazona. El acoplamiento azida-acetileno que une las partes L1 y L2 da como resultado la fracción de triazol, como se muestra. El conector escindible ('CL') es la fracción de hidrazona en el conjugado, que es escindible en condiciones de pH bajo de ciertos compartimentos intracelulares.



(10)

Ventajosamente, cuando el fármaco bifuncional contiene una fracción reactiva al tiol como grupo de unión al anticuerpo, los tioles en el anticuerpo se generan en los grupos lisina del anticuerpo usando un reactivo de tiolación. Los métodos para introducir grupos tiol en los anticuerpos mediante modificaciones de los grupos lisina de los MAb son bien conocidos en la técnica (Wong en *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1991), pp 20-22). Alternativamente, la reducción suave de los enlaces disulfuro entre cadenas en el anticuerpo (Wilner et al., *Bioconjugate Chem.* 4:521-527 (1993)) usando agentes reductores como ditiotreitól (DTT) puede generar de 7 a 10 tioles en el anticuerpo; lo que tiene la ventaja de incorporar múltiples fracciones de CPT tras la reacción con [L]-éster-CPT de la fórmula general dada anteriormente, en la región entre cadenas de MAb lejos de la región de unión al antígeno. De esta manera, el CPT con un grupo reactivo a tiol puede conjugarse con el MAb bien específicamente en las cisteínas generadas por reducción de disulfuro, bien indirectamente en las cadenas laterales de lisina del MAb derivatizado para que posea grupos tiol.

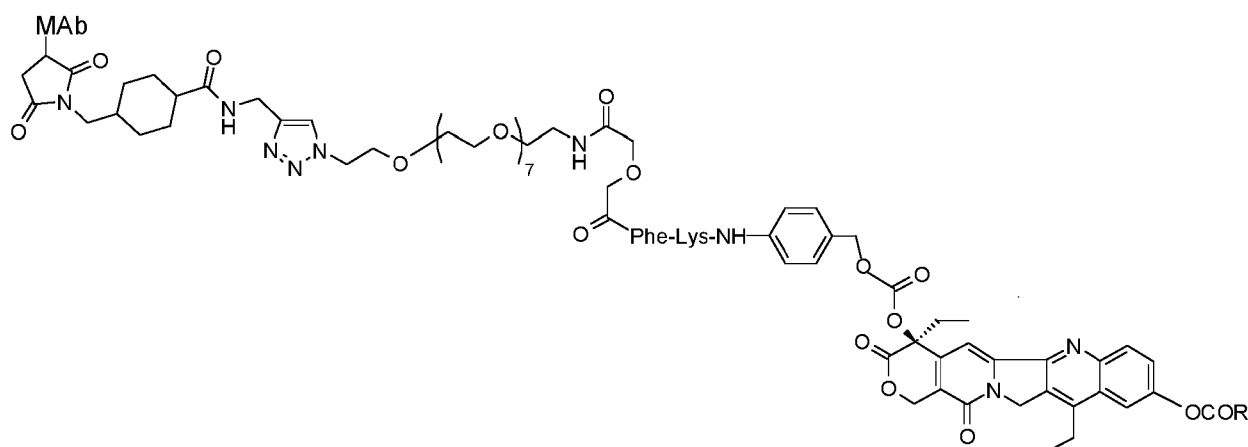
En una realización preferida de la presente invención como se define en las reivindicaciones, la fracción quimioterapéutica preferida se selecciona del grupo que consiste en CPT, 10-hidroxycamptotecina, SN-38, topotecán, lurtotecán, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina y derivados de los mismos. En una realización más preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, la fracción quimioterapéutica es SN-38. Preferiblemente, en

los conjugados de las realizaciones preferidas de la presente invención como se define en las reivindicaciones, la fracción de direccionamiento se enlaza con por lo menos una fracción quimioterapéutica; preferiblemente de 1 a aproximadamente 12 fracciones quimioterapéuticas; más preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 fracciones quimioterapéuticas.

Además, el componente conector 'L3' puede comprender un grupo tiol que reacciona con un residuo reactivo a tiol introducido en uno o más grupos amino de cadena lateral de lisina de dicha fracción de direccionamiento. En tales casos, el anticuerpo se prederivatiza con un grupo reactivo a tiol como una maleimida, vinilsulfona, bromoacetamida, o yodoacetamida mediante procedimientos bien descritos en la técnica.

En el contexto de la invención como se define en las reivindicaciones, se descubrió sorprendentemente un proceso mediante el cual pueden prepararse conectores de fármacos CPT en los que el CPT tiene además un grupo 10-hidroxilo. Este proceso implica, pero no se limita a, la protección de dicho grupo 10-hidroxilo como un derivado de t-butiloxicarbonilo (BOC), seguido de la preparación del penúltimo producto intermedio del conjugado fármaco-conector. Habitualmente, la eliminación del grupo BOC requiere un tratamiento con un ácido fuerte como el ácido trifluoroacético (TFA). En estas condiciones, el carbonato de 20-O-conector de CPT, que contiene grupos protectores que deben eliminarse, también es susceptible de escisión, dando lugar así a CPT no modificada. De hecho, la justificación de usar un grupo protector de metoxitritilo (MMT) ligeramente eliminable para la cadena lateral de lisina de la molécula conectora, como se enuncia en la técnica, era precisamente evitar esta posibilidad (Walker et al., 2002). Se descubrió que la eliminación selectiva del grupo protector fenólico BOC es posible llevando a cabo reacciones de corta duración, óptimamente de 3 a 5 minutos. En estas condiciones, el producto predominante era aquel en el que se eliminaba el 'BOC' en la posición 10-hidroxilo, mientras que el carbonato en la posición '20' permanecía intacto.

Un enfoque alternativo implica proteger la posición 10-hidroxi de los análogos de CPT con un grupo distinto del 'BOC', de tal manera que el producto final esté listo para la conjugación con anticuerpos sin necesidad de desproteger el grupo protector 10-OH. Dicho grupo protector 10-hidroxi, que convierte el 10-OH en un carbonato fenólico o un éster fenólico, se desprotege fácilmente por condiciones de pH fisiológico o por esterases tras la administración *in vivo* de los conjugados. La eliminación más rápida de un carbonato fenólico en la posición 10 frente a 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)). La estructura 11 a continuación muestra el conjugado SN-38 de esta realización, con un grupo protector 10-hidroxi en SN-38 mostrado como 'COR' donde R puede ser un alquilo sustituido como 'N(CH₃)₂-(CH₂)_n-' donde n es 2-10 y en donde el grupo amino terminal está opcionalmente en forma de una sal cuaternaria para solubilidad acuosa mejorada, o un residuo alquilo simple como 'CH₃-(CH₂)_n-' donde n es 0-10, o puede ser una fracción alcoxi como 'CH₃-(CH₂)_n-O-' donde n es 0-10 o 'N(CH₃)₂-(CH₂)_n-O-' donde n es 2-10, o 'R₁O-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₂-CH₂-O-' donde R₁ es etilo o metilo y n es un número entero con valores de 0-10. Estos derivados 10-hidroxi se preparan fácilmente mediante tratamiento con el cloroformiato del reactivo elegido, si el derivado final ha de ser un carbonato. Típicamente, la camptotecina que contiene 10-hidroxi como SN-38 se trata con un equivalente molar del cloroformiato en dimetilformamida que usa trietilamina como la base. En estas condiciones, la posición 20-OH no se ve afectada. Para formar 10-O-ésteres, se usa el cloruro de ácido del reactivo elegido.



(11)

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la fracción de direccionamiento es un anticuerpo monoclonal (MAb). En una realización adicional de la invención como se define en las reivindicaciones, la fracción de direccionamiento puede ser un MAb multivalente y/o multiespecífico. La fracción de direccionamiento puede ser un anticuerpo monoclonal murino, quimérico, humanizado o humano, y dicho anticuerpo puede estar intacto, en forma de fragmento (Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂), o subfragmento (construcciones de cadena sencilla), o de un isotipo

de IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4, IgA, o submoléculas de los mismos.

En una realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, la fracción de direccionamiento 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 hematopoyético, carcinoma, sarcoma, melanoma o un tumor glial. Una enfermedad maligna preferida a tratar de acuerdo con la presente invención es un tumor sólido maligno o una neoplasia hematopoyética.

En una realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, la fracción escindible intracelularmente puede ser escindida después de ser internalizada en la célula al ser unida por el conjugado MAb-fármaco a un receptor de la misma, y particularmente escindida por esterases y peptidasas.

La fracción de direccionamiento es un anticuerpo (incluyendo anticuerpos totalmente humanos, no humanos, humanizados o quiméricos) o un fragmento de anticuerpo (incluyendo 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 monoespecíficos, como se ha definido anteriormente.

Las proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas o multivalentes y monoespecíficas pueden ser proteínas de fusión. En una realización preferida de la invención tal como se define en las reivindicaciones, las proteínas de fusión se ensamblan mediante la tecnología 'dock and lock (DNL)' (Rossi EA, et al., Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:6841-6846; Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20060228300; 20070086942 y 20070140966). La técnica DNL se basa en la formación de complejos de moléculas de unión de origen natural, por ejemplo, entre las regiones de dominio de dimerización y de acoplamiento (DDD) de las subunidades reguladoras de la proteína quinasa dependiente de cAMP y la secuencia de dominio de anclaje (AD) obtenida de una amplia variedad de proteínas de anclaje de A-quinasas (AKAPs). Los dominios DDD dimerizan espontáneamente y luego se unen a una única secuencia AD. Así, varios efectores pueden unirse a las secuencias DDD y AD para formar complejos de estequiometría definida. En el caso más sencillo, el resultado es un trímero compuesto por dos subunidades idénticas que incorporan una secuencia DDD y una subunidad que incorpora una secuencia AD. Sin embargo, son posibles muchas variaciones de tales ensamblajes, incluyendo homodímeros, homotetrámeros, heterotetrámeros y homo o heterohexámeros (véanse las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20060228357 y 20070140966). A continuación, se describen secuencias DDD y AD ejemplares que pueden usarse en el método DNL para formar complejos sintéticos.

DDD1
SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 1)

DDD2
CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:2)

AD1
QIEYLAKQIVDNAIQQ (SEQ ID NO:3)

AD2
CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO:4)

En una realización preferida de la presente invención, se usan MABs que reconocen o se unen a marcadores o antígenos asociados a tumores que se expresan a altos niveles en las células diana y que se expresan predominantemente o sólo en las células enfermas frente a los tejidos normales, y anticuerpos que se internalizan rápidamente. Los anticuerpos útiles dentro del alcance de la presente invención incluyen MABs con propiedades como las descritas anteriormente (y muestran propiedades distintivas de diferentes niveles de internalización en células y microorganismos), y contemplan el uso de, pero no se limitan a, en cáncer, los siguientes MABs: LL1 (anti-CD74), LL2 y RFB4 (anti-CD22), RS7 (antiglicoproteína epitelial-1 (EGP-1)), PAM-4 y KC4 (ambos antimucina), MN-14 (antígeno anticarcinoembrionario (CEA, también conocido como CD66e), MN-3 o MN-15 (NCA o CEACAM6), Mu-9 (antígeno-p específico del colon), Immu 31 (una antialfa-fetoproteína), TAG-72 (por ejemplo, CC49), Tn, J591 (anti-PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata)), G250 (un MAB anticarbónico de la anhidrasa IX) y L243 (anti-HLA-DR). Tales anticuerpos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 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 Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040185053; 20040202666; 20050271671; 20060193865; 20060210475; 20070087001.)

Otros antígenos útiles a los que se puede apuntar usando estos conjugados son HER-2/neu, BrE3, CD19, CD20 (por ejemplo, C2B8, hA20, 1F5 MABs), CD21, CD23, CD37, CD38, CD40, CD45, CD74, CD79, CD80, CD138, CEACAM5, CEACAM6, alfa-fetoproteína (AFP), VEGF (por ejemplo, AVASTIN®, variante de empalme de fibronectina), fibronectina ED-B (por ejemplo, L19), receptor EGF o ErbB1 (por ejemplo, ERBITUX®), ErbB2, ErbB3,

factor de crecimiento placentario (PIGF), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, PSMA, gangliósidos, HCG, EGP-2 (por ejemplo, 17-1A), CD37, HLA-DR, CD30, Ia, A3, A33, Ep-CAM, KS-1, Le(y), mesotelina, S100, PSA (antígeno prostático específico), tenascina, receptor de folato, antígenos de Thomas-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, antígenos de angiogénesis tumoral, Ga 733, IL-2, IL-6, T101, MAGE, factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF), factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF), antígeno HLA-DR al que se une L243, antígenos CD66, es decir., CD66a-d o una combinación de los mismos, así como antígenos de células madre cancerígenas, como CD133 y CD44.

Los antígenos CD66 consisten en cinco glicoproteínas diferentes con estructuras similares, CD66a-e, codificadas por los miembros de la familia genética del antígeno carcinoembrionario (CEA), BCG, CGM6, NCA, CGM1 y CEA, respectivamente. Estos antígenos CD66 (por ejemplo, CEACAM6) se expresan principalmente en granulocitos, células epiteliales normales del tracto digestivo y células tumorales de varios tejidos. También se incluyen como dianas adecuadas para los cánceres los antígenos testiculares del cáncer, como NY-ESO-1 (Theurillat et al., Int. J. Cancer 2007; 120(11):2411-7), así como CD79a en la leucemia mieloide (Kozlov et al., Cancer Genet. Cytogenet. 2005; 163(1):62-7) y también enfermedades de células B, y CD79b para el linfoma no Hodgkin (Poison et al., Blood 110(2):616-623). Una serie de los antígenos mencionados anteriormente se divulgan en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de Serie 60/426.379, titulada 'Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics', presentada el 15 de noviembre de 2002. Las células madre cancerígenas, a las que se atribuye que son poblaciones de células malignas precursoras más resistentes a las terapias (Gan, J Cell Mol. Med. 2007, 5 de diciembre [publicación electrónica antes de impresión]; Hill y Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99(19):1435-40), tienen antígenos que pueden ser diana en ciertos tipos de cáncer, como el CD133 en el cáncer de próstata (Maitland et al., Ernst Schering Found. Sympos. Proc. 2006; 5:155-79), cáncer de pulmón de células no pequeñas (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 cáncer colorrectal (Dalerba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(24):10158-63), cáncer de páncreas (Li et al., Cancer Res. 2007; 67(3):1030-7), y en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Prince et al., Proc. Acad. Sci. USA 2007; 104(3):973-8).

En la terapia del mieloma múltiple, se han descrito anticuerpos de direccionamiento 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 (epub antes de impresión), y CD40 (Tai et al., 2005; Cancer Res. 65(13):5898-5906).

Un análisis exhaustivo reciente de las dianas antigénicas adecuadas (designación de grupos o CD) en las células hematopoyéticas malignas, tal como muestra la citometría de flujo y que puede servir de guía para seleccionar los anticuerpos adecuados para la inmunoterapia conjugada con fármacos es Craig y Foon, Blood prepublicado online el 15 de enero de 2008; DOL 10.1182/blood-2007-11-120535,

En otra realización preferida de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, se usan anticuerpos que se internalizan rápidamente y luego se vuelven a expresar, se procesan y presentan en las superficies celulares, lo que permite la captación y acumulación continuas del conjugado circulante por la célula. Un ejemplo del par anticuerpo/antígeno más preferido es LL1, un MAb anti-CD74 (cadena invariante, chaperona específica de clase II, Ii) (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.653.104; 7.312.318; y las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020187153; 20030220470; 20040185053; 20040202666; 20040219203; 20050271671; 20060014245; 20060193865; 20070207146). El antígeno CD74 está altamente expresado en linfomas de células B (incluido el mieloma múltiple) y leucemias, ciertos linfomas de células T, melanomas, cánceres de colon, pulmón y riñón, glioblastomas y otros tipos de cáncer (Ong et al., Immunology 98:296-302 (1999)), así como en ciertas enfermedades autoinmunes. En Stein et al., Clin Cancer Res. 2007 Sep 15;13(18 Pt 2):5556s-5563s, figura una revisión del uso de anticuerpos CD74 en el cáncer.

Las enfermedades que se tratan preferiblemente con anticuerpos anti-CD74 incluyen, entre otras, el linfoma no Hodgkin, la enfermedad de Hodgkin, el melanoma, los cánceres de pulmón, renal y de colon, el glioblastoma multiforme, los histiocitomas, las leucemias mieloides y el mieloma múltiple. La expresión continua del antígeno CD74 durante breves periodos de tiempo en la superficie de las células diana, seguido de la internalización del antígeno, y la reexpresión del antígeno, permite que el anticuerpo LL1 diana sea internalizado junto con cualquier fracción quimioterapéutica que lleve. Esto permite acumular en el interior de dichas células una concentración elevada y terapéutica del conjugado LL1-fármaco quimioterapéutico. Los conjugados LL1-fármaco quimioterapéutico internalizados pasan a través de los lisosomas y endosomas, y la fracción quimioterapéutica se libera en forma activa dentro de las células diana.

De acuerdo con la presente invención, como se define en las reivindicaciones, el conjugado de un fármaco de camptotecina (CPT) y una fracción de direccionamiento es para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, en donde el método comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado terapéutico como se describe en la presente. Las enfermedades que pueden tratarse con los conjugados terapéuticos de las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedades malignas de células B (por ejemplo, linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica usando, por ejemplo, LL2 MAb;

véase la Patente de Estados Unidos Nº 6.183.744), adenocarcinomas de epitelios del sistema digestivo derivados del endodermo, cánceres como cáncer de mama y cáncer de pulmón de células no pequeñas, 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 una neoplasia hematopoyética, por ejemplo, un tumor gastrointestinal, de pulmón, de mama, de próstata, de ovario, testicular, cerebral o linfático, un sarcoma o un melanoma. Tales agentes terapéuticos pueden administrarse una o varias veces, dependiendo del estado de la enfermedad y de la tolerabilidad del conjugado, y también pueden usarse óptimamente en combinación con otras modalidades terapéuticas, como cirugía, radiación externa, radioinmunoterapia, inmunoterapia, quimioterapia, terapia antisentido, terapia de ARN de interferencia, terapia génica y similares. Cada combinación se adaptará al tipo de tumor, estadio, estado del paciente y terapia previa, así como a otros factores que considere el médico responsable.

Como se usa en la presente, el término 'sujeto' se refiere a cualquier animal (es decir, vertebrados e invertebrados), incluyendo, entre otros, los mamíferos, incluyendo los seres humanos. El término sujeto también incluye roedores (por ejemplo, ratones, ratas y cobayas). No se pretende que el término se limite a una edad o sexo particulares. Por tanto, el término engloba a sujetos adultos y recién nacidos, así como a fetos, ya sean varones o hembras.

En otra realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb Mu-9 de las realizaciones preferidas de la presente invención pueden usarse para tratar cánceres colorrectales, así como pancreáticos y ováricos, como se divulga en la Patente de Estados Unidos Nº 6.962.702 y la Solicitud de Estados Unidos Nº de Serie 10/116.116, presentada el 5 de abril de 2002, y por Gold et al. (Cancer Res. 50: 6405 (1990), y referencias citadas en la misma). Además, los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb PAM-4 de las realizaciones preferidas de la presente invención pueden usarse para tratar el cáncer de páncreas, como se divulga en la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº de Serie 60/388,314, presentada el 14 de junio de 2002, y en las Patentes de Estados Unidos Nº 7,238,786 y 7,282,567.

En otra realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb RS7 (que se une al antígeno de glicoproteína epitelial-1 [EGP-1]) de las realizaciones preferidas pueden usarse para tratar carcinomas como carcinomas de pulmón, estómago, vejiga urinaria, mama, ovario, útero y próstata, como se divulga en la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº de Serie 60/360,229, presentada el 1 de marzo de 2002, y la Patente de Estados Unidos Nº 7,238,785 y por Stein et al. (Cancer Res. 50: 1330 (1990) y Antibody Immunoconj. Radiopharm. 4: 703 (1991)).

En otra realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb anti-AFP de las realizaciones preferidas pueden usarse para tratar carcinoma hepatocelular, tumores de células germinales, y otros tumores productores de AFP usando formas de anticuerpos humanizados, quiméricos y humanos, como se divulga en la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº de Serie 60/399,707, presentada el 1 de agosto de 2002, y la Patente de Estados Unidos Nº 7,300,655.

En otra realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, los conjugados terapéuticos que comprenden anticuerpos antitenascina pueden usarse para tratar tumores hematopoyéticos y sólidos y los conjugados que comprenden anticuerpos antitenascina pueden usarse para tratar tumores sólidos, preferiblemente cánceres cerebrales como glioblastomas.

En una realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, los anticuerpos que se usan en el tratamiento de enfermedades humanas son versiones humanas o humanizadas (injertadas con CDR) de anticuerpos; aunque pueden usarse versiones murinas y quiméricas de anticuerpos. Como agentes de administración para minimizar las respuestas inmunitarias lo más preferido son las moléculas de IgG de la misma especie. Esto es especialmente importante cuando se consideran tratamientos repetidos. En el caso de los humanos, es menos probable que un anticuerpo de IgG humano o humanizado genere una respuesta inmunitaria anti-IgG en los pacientes. Los anticuerpos como hLL1 y hLL2 se internalizan rápidamente después de unirse al antígeno de internalización de las células diana, lo que significa que el fármaco quimioterapéutico transportado también se internaliza rápidamente en las células. Sin embargo, los anticuerpos que tienen tasas de internalización más lentas también pueden usarse para efectuar una terapia selectiva con esta invención.

Los conjugados terapéuticos de la presente divulgación pueden usarse contra patógenos, ya que se conocen anticuerpos contra patógenos. Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a marcadores producidos por o asociados con lesiones infecciosas, incluyendo infecciones víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias, por ejemplo provocadas por patógenos como bacterias, rickettsias, micoplasmas, protozoos, hongos y virus, y antígenos y productos asociados con tales microorganismos se han divulgado, entre otros, en Hansen et al., Patente de Estados Unidos Nº 3,927,193 y Goldenberg Patentes de Estados Unidos Nº 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, citados anteriormente. Los patógenos pueden seleccionarse del grupo que consiste en el virus VIH causante del SIDA, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus agalactiae*, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus*

pyogenes, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemophilus influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, virus de la rabia, virus de la gripe, citomegalovirus, virus del herpes simple I, virus del herpes simple II, virus similar al parvo sérico humano, virus respiratorio sincitial, virus varicela-zóster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del sarampión, adenovirus, virus de la leucemia humana de células T, virus de Epstein-Barr, virus de la leucemia murina, virus de las paperas, virus de la estomatitis vesicular, virus sindbis, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus de las verrugas, virus de la lengua azul, virus de Sendai, virus de la leucemia felina, reovirus, virus de la polio, virus simio 40, 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*, *Mesocostoides corti*, *Mycoplasma arthritidis*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. salivarium* y *M. pneumoniae*, como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 6.440.416.

Los conjugados de fármacos de la presente divulgación que comprenden anticuerpos anti-gp120 y otros de tales anticuerpos anti-VIH pueden usarse como agentes terapéuticos para el VIH en pacientes con SIDA; y los conjugados de fármacos de anticuerpos contra *Mycobacterium tuberculosis* son adecuados como agentes terapéuticos para la tuberculosis refractaria a fármacos. Se han examinado las propiedades antivirales de proteínas de fusión de MAb anti-gp120 (MAb anti-VIH) y una toxina, como la exotoxina de *Pseudomonas* (Van Oigen et al., J Drug Target, 5:75-91, 1998). Los intentos de tratar la infección por VIH en pacientes con SIDA fracasaron, posiblemente debido a una eficacia insuficiente o a una toxicidad inaceptable para el huésped. Los conjugados de fármacos de la presente invención carecen ventajosamente de los efectos secundarios tóxicos de las toxinas proteicas y, por lo tanto, se usan ventajosamente para tratar la infección por VIH en pacientes con SIDA. Estos conjugados de fármacos pueden administrarse solos o en combinación con otros antibióticos o agentes terapéuticos que son eficaces en tales pacientes cuando se administran solos. Los anticuerpos candidatos contra el VIH incluyen el anticuerpo antienvoltura descrito por Johansson et al. (AIDS. 3 de octubre de 2006;20(15):1911-5), así como los anticuerpos contra el VIH descritos y vendidos por Polymun (Viena, Austria), también descritos en la Patente de Estados Unidos 5.831.034, la Patente de Estados Unidos 5.911.989, y Vcelar et al., AIDS 2007; 21(16):2161-2170 y Joos et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50(5): 1773-9. Un agente de direccionamiento preferido para el VIH son varias combinaciones de estos anticuerpos con el fin de superar la resistencia.

Otras enfermedades que pueden tratarse usando los conjugados terapéuticos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de desregulación inmunitaria y enfermedades autoinmunes relacionadas, incluyendo enfermedades autoinmunes de Clase III como trombocitopenias inmunomediadas, como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, corea de Sydenham, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide bulloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis postestreptocócica, eritema nodoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterans, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, artritis reumatoide, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pampfigus vulgaris, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis/polimialgia de células gigantes, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva y alveolitis fibrosante, y también diabetes juvenil, según se divulga en la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº de Serie 60/360,259, presentada el 1 de marzo de 2002. Los anticuerpos típicos útiles en estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, aquellos reactivos con antígenos de 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. Como muchas de estas enfermedades autoinmunes se ven afectadas por autoanticuerpos producidos por poblaciones de células B aberrantes, el agotamiento de estas células B mediante conjugados terapéuticos que incluyen tales conjugados anticuerpos-agente terapéutico descritos en la presente es un método preferido de terapia para enfermedades autoinmunes, especialmente cuando los anticuerpos de células B se combinan, en ciertas circunstancias, con anticuerpos de HLA-DR y/o anticuerpos de células T (incluyendo los que se dirigen a IL-2 como antígeno, como el anticuerpo anti-TAC). En una realización preferida, los anticuerpos anti-células B, anti-células T, o anti-macrófagos u otros anticuerpos de este tipo de uso en el tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunes también pueden conjugarse para dar como resultado agentes terapéuticos más eficaces para controlar las respuestas del huésped implicadas en dichas enfermedades autoinmunes, y pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, como inhibidores del TNF o anticuerpos contra TNF, anticuerpos no conjugados de células B o T, y similares.

En una realización preferida de esta invención como se define en las reivindicaciones, puede lograrse una incorporación más eficaz en células y patógenos usando anticuerpos multivalentes, multispecíficos o multivalentes, mono-específicos. Multivalente significa el uso de varios brazos de unión contra el mismo antígeno o epítopo o uno diferente expresado en las células, mientras que los anticuerpos multispecíficos implican el uso de múltiples brazos

de unión para dirigirse por lo menos a dos antígenos o epítomos diferentes contenidos en la célula o patógeno diana. Ejemplos de tales anticuerpos bivalentes y biespecíficos se encuentran en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos 60/399,707, presentada el 1 de agosto de 2002; 60/360,229, presentada el 1 de marzo de 2002; 60/388,314, presentada el 14 de junio de 2002; y 10/116,116, presentada el 5 de abril de 2002. Estos anticuerpos multivalentes o multiespecíficos son particularmente preferibles en el direccionamiento de cánceres y organismos infecciosos (patógenos), que expresan múltiples dianas de antígenos e incluso múltiples epítomos de la misma diana de antígeno, pero que a menudo eluden el direccionamiento de anticuerpos y la unión suficiente para la inmunoterapia debido a la insuficiente expresión o disponibilidad de una única diana de antígeno en la célula o patógeno. Al dirigirse a múltiples antígenos o epítomos, dichos anticuerpos muestran una mayor unión y tiempo de permanencia en la diana, proporcionando de este modo una mayor saturación con el fármaco al que se dirigen en esta invención.

En otra realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, un agente terapéutico usado en combinación con el conjugado de camptotecina de esta invención puede comprender uno o más isótopos, como ^{212}Bi , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{94}Tc , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{111}In . Los metales no radiactivos, como el manganeso, el hierro y el gadolinio, son útiles para la imagenología nuclear o la MRI, cuando se usan junto con las estructuras ancladas de manera estable y los portadores descritos en la presente, o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, cuando se usa un radionucleido emisor beta- alfa- o Auger-), todos los cuales se contemplan como útiles en la presente. Los quelatos macrocíclicos como NOTA, DOTA y TETA se usan con una variedad de metales y radiometales, con más particularidad con radionucleidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Estos complejos de quelato metálico pueden hacerse muy estables adaptando el tamaño del anillo al metal de interés. Pueden usarse otros quelatos de tipo anular, como los poliéteres macrocíclicos para formar complejos con ^{223}Ra . Los agentes terapéuticos para su uso en combinación con el conjugado de camptotecina de esta invención también incluyen, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos como alcaloides de vinca, antraciclinas, epidofilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de Cox-2, antimitóticos, agentes antiangiogénicos y proapoptóticos, en particular doxorubicina, metotrexato, taxol, otras camptotecinas, y otros de estas y otras clases de agentes anticancerígenos, y similares. Otros fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen mostazas nitrogenadas, alquil sulfonatos, nitrosoureas, triazenos, análogos del 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, 19ª Ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7ª Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985), así como en las ediciones revisadas de estas publicaciones. Los expertos en la técnica conocen otros agentes quimioterapéuticos adecuados, como los fármacos experimentales.

Otra clase de agentes terapéuticos consiste en radionucleidos que emiten partículas α (como ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{223}Ra , ^{225}Ac), partículas β (como ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{111}Ag , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{166}Dy , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re), o electrones Auger (como ^{111}In , ^{125}I , ^{67}Ga , ^{191}Os , $^{193\text{m}}\text{Pt}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, $^{195\text{m}}\text{Hg}$). Alternativamente, los agentes terapéuticos pueden comprender un radioisótopo útil para la imagenología de diagnóstico. Los radioisótopos adecuados pueden incluir aquellos en el intervalo de energía de 60 a 4.000 KeV, o más específicamente, ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{45}Ti , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{154}Gd , ^{177}Lu , ^{32}P , ^{188}Re , y similares, o una combinación de los mismos. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos titulada 'Labeling Targeting Agents with Gallium-68' (Griffiths, G.L. and W.J. McBride, W.J., Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/342,104) que divulga emisores de positrones, como ^{18}F , ^{68}Ga , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, y similares, para propósitos de imagenología. La detección puede lograrse, por ejemplo, mediante tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), o tomografía por emisión de positrones (PET). La aplicación también puede ser para el diagnóstico intraoperatorio para identificar tumores neoplásicos ocultos. Los agentes terapéuticos de imagenología pueden incluir uno o más agentes potenciadores de la imagen, que pueden incluir complejos de metales seleccionados del grupo que consiste en cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III).

En otras realizaciones más de la invención como se define en las reivindicaciones, un agente terapéutico puede comprender uno o más isótopos radiactivos útiles para matar células neoplásicas u otras células que se dividen rápidamente, que incluyen emisores β (como ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{111}Ag , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{166}Dy , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re), emisores de electrones Auger (como ^{111}In , ^{125}I , ^{67}Ga , ^{191}Os , $^{193\text{m}}\text{Pt}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, $^{195\text{m}}\text{Hg}$), emisores α (como ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{223}Ra , ^{225}Ac), o una combinación de los mismos.

Los agentes terapéuticos que se usarán junto con los conjugados de camptotecina también pueden ser toxinas conjugadas con fracciones de direccionamiento. Las toxinas que pueden usarse a este respecto incluyen la ricina, la abrina, la ribonucleasa (RNasa), la DNasa I, la enterotoxina estafilocócica A, la proteína antiviral pokeweed, la gelonina, la toxina differina, la exotoxina de *Pseudomonas* y la endotoxina de *Pseudomonas*. (Véase, por ejemplo, Pastan. et al., Cell (1986), 47:641, y Sharkey y Goldenberg, CA Cancer J Clin. 2006 Jul-Ago;56(4):226-43.) Las toxinas adicionales adecuadas para su uso en la presente son conocidas por los expertos en la técnica y se divulgan en el documento U.S. 6,077,499.

En varias realizaciones de la invención, como se define en las reivindicaciones, un conjugado tal como se divulga en la presente puede formar parte de un anticuerpo compuesto, multiespecífico. Tales anticuerpos pueden

contener dos o más sitios de unión a antígeno diferentes, con especificidades distintas. El compuesto multispecífico puede unirse a diferentes epítopos del mismo antígeno, o alternativamente puede unirse a dos antígenos diferentes. Algunas de las combinaciones de diana más preferidas incluyen las siguientes. Esta es una lista de ejemplos de combinaciones preferidas, pero no se pretende que sea exhaustiva.

Tabla 1. Algunos ejemplos de anticuerpos multispecíficos.

Primera diana	Segunda diana
MIF	Una segunda citoquina efectora proinflamatoria, especialmente HMGB-1, TNF- α , IL-1 o IL-6.
MIF	Quimiocinas efectoras proinflamatorias, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A, o MIP-1B
MIF	Receptor efector proinflamatorio, especialmente IL-6R IL-13R, e IL-15R
MIF	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
MIF	Factor del complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
MIF	Proteína reguladora del complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
MIF	Antígeno o receptor asociado al cáncer
HMGB-1	Una segunda citoquina 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 de efectores proinflamatorios, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
HMGB-1	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
HMGB-1	Factor del complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
HMGB-1	Proteínas reguladoras del complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
HMGB-1	Antígeno o receptor asociado al cáncer
TNF- α	Una segunda citoquina 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 de efector proinflamatorio, especialmente IL-6R IL-13R, e IL-15R
TNF- α	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
TNF- α	Factor del complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
TNF- α	Proteína reguladora del complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
TNF- α	Antígeno o receptor asociado al cáncer
LPS	Citoquina 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, e IL-15R
LPS	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
LPS	Factor del complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
LPS	Proteína reguladora del complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
TF o trombina	Citoquina 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 de efector proinflamatorio, especialmente IL-6R, IL-13R e IL-15R
TF o trombina	Factor del complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
TF o trombina	Proteína reguladora del complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
TF o trombina	Antígeno o receptor asociado al cáncer

Otras combinaciones más, como las preferidas para terapias contra el cáncer, incluyen anticuerpos CD20 + CD22, anticuerpos CD74 + CD20, anticuerpos CD74 + CD22, anticuerpos CEACAM5 (CEA) + CEACAM6 (NCA), anticuerpos factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF) + CEACAM5, anticuerpos EGP-1 (por ejemplo, RS-7) + ILGF, anticuerpos CEACAM5 + EGFR. Tales anticuerpos no sólo deben usarse en combinación, sino que pueden combinarse como proteínas de fusión de varias formas, como IgG, Fab, scFv y similares, como se describe en las Patentes de Estados Unidos M^o 6.083.477; 6.183.744 y 6.962.702 y en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N^o 20030124058; 20030219433; 20040001825; 20040202666; 20040219156; 20040219203; 20040235065; 20050002945; 20050014207; 20050025709; 20050079184; 20050169926; 20050175582; 20050249738; 20060014245 y 20060034759.

En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, las fracciones de unión descritas en la presente pueden comprender una o más secuencias de avímeros. Los avímeros son una clase de proteínas de unión algo similares a los anticuerpos en sus afinidades y especificidades para varias moléculas diana. Se desarrollaron a partir de dominios de receptores extracelulares humanos mediante transposición de exones *in vitro* y presentación en fagos. A continuación, se describen con más detalle los métodos de construcción y uso de avímeros.

Producción de fragmentos de anticuerpos

Los métodos de producción de anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica y puede usarse cualquiera de tales métodos conocidos para producir anticuerpos del uso en la invención como se define en las reivindicaciones. Algunas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones pueden referirse a fragmentos de anticuerpos. Tales fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denotado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes 3,5S Fab'. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc. Los métodos ejemplares para producir fragmentos de anticuerpos se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 4,036,945; Patente de Estados Unidos N° 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, página 422 (Academic Press), y Coligan et al. (eds.), 1991, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, (John Wiley & Sons).

También pueden usarse otros métodos de escisión de anticuerpos, como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadenas ligeras-pesadas, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno 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. Alternativamente, las cadenas variables pueden enlazarse por un enlace disulfuro intermolecular o reticularse por productos químicos como el glutaraldehído. Véase Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437.

Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un conector peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L, conectados por una secuencia conectora de oligonucleótidos. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que posteriormente se introduce en una célula huésped, como E. coli. Las células huésped recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido conector que forma puente entre los dos dominios V. Los métodos para producir sFvs son bien 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; Patente de Estados Unidos N° 4,946,778; Pack et al., 1993, Bio/Technology, 11:1271, y Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437.

Otra forma de fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR ('unidades mínimas de reconocimiento') pueden obtenerse construyendo genes que codifiquen la 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 a partir de ARN de células productoras de 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, páginas 166-179 (Cambridge University Press); Birch et al., (eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, páginas 137-185 (Wiley-Liss, Inc.).

Anticuerpos quiméricos y humanizados

Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante en la que las regiones variables de un anticuerpo humano han sido sustituidas por las regiones variables de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, incluyendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de ratón. Los anticuerpos quiméricos presentan menor inmunogenicidad y mayor estabilidad cuando se administran a un sujeto. Los métodos para construir anticuerpos quiméricos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Leung et al., 1994, Hybridoma 13:469).

Un anticuerpo monoclonal quimérico puede humanizarse transfiriendo las CDR de ratón de las cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón a los dominios variables correspondientes de un anticuerpo humano. Las regiones marco (FR) de ratón en el anticuerpo monoclonal quimérico también se sustituyen por secuencias FR humanas. Para conservar la estabilidad y la especificidad antigénica del monoclonal humanizado, pueden sustituirse uno o más residuos de FR humanos por los residuos homólogos de ratón. Los anticuerpos monoclonales humanizados pueden usarse para el tratamiento terapéutico de sujetos. La afinidad de los anticuerpos humanizados por una diana también puede aumentarse mediante la modificación seleccionada de las secuencias CDR (WO0029584A1). Las técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales humanizados son bien conocidas en la técnica. (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 de la invención como se definen en las reivindicaciones pueden referirse a anticuerpos de primates no humanos. Técnicas generales para generar anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos pueden encontrarse, por ejemplo, en Goldenberg et al., 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 se obtienen de ratones transgénicos que han sido manipulados para que produzcan anticuerpos humanos específicos en respuesta a un desafío antigénico. En esta técnica, se introducen elementos del locus de las cadenas pesadas y ligeras humanas en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones dirigidas de los loci de las cadenas pesadas y ligeras endógenas. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de 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).

Anticuerpos humanos

En la técnica se conocen los métodos para producir anticuerpos completamente humanos usando enfoques combinatorios o animales transgénicos transformados con loci de inmunoglobulina humana (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 estos anticuerpos totalmente humanos presenten incluso menos efectos secundarios que los anticuerpos quiméricos o humanizados y que funcionen in vivo como anticuerpos humanos esencialmente endógenos. En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, pueden usarse anticuerpos humanos producidos mediante dichas técnicas.

En una alternativa, puede usarse la técnica de presentación en fagos 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 presenten un estado de enfermedad particular, como el cáncer (Dantas-Barbosa et al., 2005). La ventaja de construir anticuerpos humanos a partir de un individuo enfermo es que el repertorio de anticuerpos circulantes puede estar sesgado hacia anticuerpos contra antígenos asociados a la enfermedad.

En un ejemplo no limitativo de esta metodología, Dantas-Barbosa et al. (2005) construyeron una biblioteca de presentación en fagos de fragmentos de anticuerpos Fab humanos procedentes de pacientes con osteosarcoma. En general, el ARN total se obtuvo a partir de linfocitos de sangre circulantes (*Id.*) Se clonaron Fab recombinantes de los repertorios de anticuerpos de cadena μ , y γ y κ y se insertaron en una biblioteca de presentación en fagos (*Id.*) Los ARN se convirtieron en ADNc y se usaron para elaborar bibliotecas de ADNc Fab usando cebadores específicos contra las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera (Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97). La construcción de las bibliotecas se realizó según Andris-Widhopf et al. (2000, En: *Phage Display Laboratory Manual*, Barbas et al. (eds), 1ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 9.1 a 9.22). Los fragmentos Fab finales se digirieron con endonucleasas de restricción y se insertaron en el genoma del bacteriófago para elaborar la biblioteca de presentación en fagos. Tales bibliotecas pueden cribarse mediante métodos estándar de presentación en fagos. Los expertos en la técnica comprenderán que esta técnica es sólo un ejemplo y que puede usarse cualquier método conocido para elaborar y cribar anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos mediante presentación en fagos.

En otra alternativa, pueden usarse animales transgénicos que han sido manipulados genéticamente para que produzcan anticuerpos humanos para generar anticuerpos contra esencialmente cualquier diana inmunogénica, usando protocolos de inmunización estándar como los comentados anteriormente. Un ejemplo no limitativo de tal sistema es el XenoMouse® (por ejemplo, Green et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23) de Abgenix (Fremont, CA). En el XenoMouse® y animales similares, los genes de anticuerpos de ratón han sido inactivados y sustituidos por genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que el resto del sistema inmunitario del ratón permanece intacto.

El XenoMouse® se transformó con YAC (cromosomas artificiales de levadura) configurados a partir de la línea germinal que contenían porciones de los loci IgH e Ig kappa humanos, incluyendo la mayoría de las secuencias de la región variable, junto con genes accesorios y secuencias reguladoras. El repertorio de la región variable humana puede usarse para generar células B productoras de anticuerpos, que pueden procesarse en hibridomas mediante técnicas conocidas. Un XenoMouse® inmunizado con un antígeno diana producirá anticuerpos humanos por la respuesta inmunitaria normal, que pueden recogerse y/o producirse mediante las técnicas estándar analizadas anteriormente. Hay una variedad de cepas de XenoMouse®, cada una de las cuales es capaz de producir una clase diferente de anticuerpos. Tales anticuerpos humanos pueden acoplarse a otras moléculas mediante reticulación química u otras metodologías conocidas. Se ha demostrado que los anticuerpos humanos producidos transgénicamente tienen potencial terapéutico, a la vez que conservan las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos humanos normales (Green et al., 1999). Los expertos en la técnica se darán cuenta de que las composiciones y métodos reivindicados no se limitan al uso del sistema XenoMouse®, sino que pueden utilizar cualquier animal transgénico que haya sido manipulado genéticamente para que produzca anticuerpos humanos.

Avímeros

En ciertas realizaciones de la invención definidas en las reivindicaciones, los precursores, monómeros y/o

complejos descritos en la presente pueden comprender una o más secuencias er. Los avímeros son una clase de proteínas de unión algo similares a los anticuerpos en sus afinidades y especificidades para varias moléculas diana. Se desarrollaron a partir de dominios de receptores extracelulares humanos mediante transposición de exones *in vitro* y presentación en 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 mostrar una afinidad mejorada (en algunos casos subnanomolar) y especificidad en comparación con las proteínas de unión a un solo epítipo. (*Id.*) En varias realizaciones, los avímeros pueden unirse, por ejemplo, a secuencias DDD y/o AD para su uso en los métodos y composiciones reivindicados. Detalles adicionales referentes a los métodos de construcción y uso de avímeros se divulgan, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 y 20050221384.

Presentación en fagos

Ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones comprenden péptidos de unión y/o miméticos peptídicos de varias moléculas, células o tejidos diana. Los péptidos de unión pueden identificarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pero no limitado a la técnica de presentación en fagos. Varios métodos de presentación en fagos y técnicas para producir diversas poblaciones de péptidos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5,223,409; 5,622,699 y 6,068,829, divulgan métodos para preparar una biblioteca de fagos. La técnica de presentación en fagos implica la manipulación genética de bacteriófagos para que puedan expresarse péptidos pequeños en su superficie (Smith y Scott, 1985, Science 228:1315-1317; Smith y Scott, 1993, Meth. Enzymol. 21:228-257).

En la última década se han producido avances considerables en la construcción de bibliotecas de péptidos presentados en fagos y en el desarrollo de métodos de cribado en los que las bibliotecas se usan para aislar ligandos peptídicos. Por ejemplo, el uso de bibliotecas de péptidos ha permitido caracterizar los sitios de interacción y los motivos de unión receptor-ligando dentro de muchas proteínas, como los anticuerpos implicados en reacciones inflamatorias o las integrinas que median la adherencia celular. Este método también se ha usado para identificar nuevos ligandos peptídicos que pueden servir como pistas para el desarrollo de fármacos peptidomiméticos o agentes de imagenología (Arap et al., 1998a, Science 279:377-380). Además de los péptidos, en la superficie de las partículas de fagos también pueden presentarse dominios proteicos de mayor tamaño, como los anticuerpos de cadena sencilla (Arap et al., 1998a).

Las secuencias de aminoácidos de direccionamiento selectivas para un órgano, tejido, tipo celular o molécula diana dados pueden aislarse mediante cribado (Pasqualini y Ruoslahti, 1996, Nature 380:364-366; Pasqualini, 1999, The Quart. J. Nucl. Med. 43: 159-162). En resumen, se administra una biblioteca de fagos que contiene péptidos de direccionamiento putativos a un organismo intacto o a órganos, tejidos, tipos de células o moléculas diana aislados y se recogen muestras que contienen fagos unidos. Los fagos que se unen a una diana pueden eluirse de un órgano, tejido, tipo de célula diana o molécula diana y luego amplificarse cultivándolos en bacterias huésped.

El fago puede propagarse en bacterias huésped entre rondas de cribado. En lugar de ser lisadas por el fago, las bacterias pueden segregar múltiples copias de fago que muestren un inserto particular. Si se desea, los fagos amplificados pueden exponerse de nuevo a los órganos, tejidos, tipos celulares o molécula dina y recogerse para rondas adicionales de cribado. Pueden realizarse múltiples rondas de cribado hasta que se obtenga una población de ligandos selectivos o específicos. La secuencia de aminoácidos de los péptidos puede determinarse secuenciando el ADN correspondiente a la inserción del péptido diana en el genoma del fago. A continuación, el péptido diana identificado puede producirse como péptido sintético mediante técnicas estándar de química de proteínas (Arap et al., 1998a, Smith et al., 1985).

Puede usarse un protocolo de sustracción para reducir aún más la unión a fagos de fondo. El propósito de la sustracción es eliminar de la biblioteca los fagos que se unen a dianas distintas de la diana de interés. Alternativamente, la biblioteca de fagos puede preseleccionarse frente a una célula, tejido u órgano de control. Por ejemplo, los péptidos de unión a tumores pueden identificarse después de preseleccionar una biblioteca frente a una línea celular normal de control. Después de la sustracción, la biblioteca puede analizarse frente a la molécula, célula, tejido u órgano de interés. Se conocen otros métodos de protocolos de sustracción y pueden usarse en la puesta en práctica de los métodos reivindicados, por ejemplo, como se divulga en las Patentes de Estados Unidos N° 5.840.841, 5.705.610, 5.670.312 y 5.492.807.

Aptámeros

En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, una fracción de direccionamiento comprende un aptámero. Los métodos de construcción y determinación de las características de unión de los aptámeros son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, tales técnicas se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 5.582.981, 5.595.877 y 5.637.459. Los métodos para la preparación y la selección de aptámeros que se unen a dianas particulares de interés son bien conocidos, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.475.096 y la Patente de Estados Unidos N° 5.270.163.

Los aptámeros pueden prepararse mediante cualquier método conocido, incluyendo los métodos sintéticos, recombinantes y de purificación, y pueden usarse solos o en combinación con otros ligandos específicos para la misma diana. En general, son necesarios un mínimo de aproximadamente 3 nucleótidos, preferiblemente por lo menos 5 nucleótidos, para efectuar la unión específica. Pueden ser factibles aptámeros de secuencias más cortas de 10 bases, aunque pueden preferirse los aptámeros de 10, 20, 30 o 40 nucleótidos.

Los aptámeros deben contener la secuencia que confiere especificidad de unión, pero pueden ampliarse con regiones flanqueantes y derivatizarse de otro modo. En realizaciones preferidas, las secuencias de unión de los aptámeros pueden estar flanqueadas por secuencias de unión a cebadores, lo que facilita la amplificación de los aptámeros mediante PCR u otras técnicas de amplificación.

Los aptámeros pueden aislarse, secuenciarse y/o amplificarse o sintetizarse como moléculas convencionales de ADN o ARN. Alternativamente, los aptámeros de interés pueden comprender oligómeros modificados. Cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los aptámeros puede sustituirse por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por un grupo protector estándar, o activarse para preparar enlaces adicionales con otros nucleótidos, o pueden conjugarse con soportes sólidos. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden sustituirse por grupos de enlace alternativos, como P(O)O sustituido 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 unirse a nucleótidos adyacentes a través de O o S. No es necesario que todos los enlaces de un oligómero sean idénticos.

Protocolos de conjugación

El protocolo de conjugación preferido se basa en una reacción tiol-maleimida, tiol-vinilsulfona, tiol-bromoacetamida o tiol-yodoacetamida, que son fáciles a pH neutro o ácido. Esto evita la necesidad de condiciones de pH más alto para las conjugaciones como, por ejemplo, sería necesario cuando se usan ésteres activos. En la sección Ejemplos se describen detalles adicionales de los protocolos de conjugación ejemplares.

Las vías de administración adecuadas de los conjugados incluyen, sin limitación, la administración oral, parenteral, rectal, transmucosal, intestinal, intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intravítrea, intraperitoneal, intranasal o intraocular. Las vías de administración preferidas son las parenterales. Alternativamente, el compuesto puede administrarse de forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección del compuesto directamente en un tumor sólido.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran varias realizaciones de la presente invención.

General

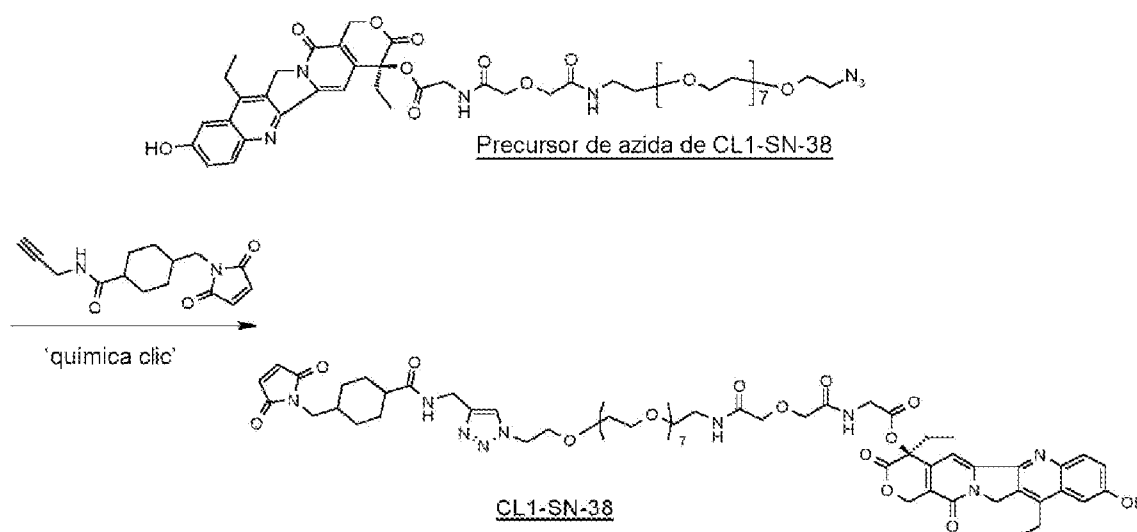
El producto intermedio Phe-Lys(MMT)-PABOH y los reticulantes Phe-Lys(MMT)-PABOH, MC-Phe-Lys(MMT)-PABOH y MC-Phe-Lys(MMT)-PABOCOO-PNP, donde MC es maleimidocaproilo, Phe es fenilalanina, Lys es lisina, MMT es monometoxitritilo, PABOH es alcohol p-aminobencílico y PNP es fracción p-nitrofenilica, se sintetizaron usando un método publicado (Dubowchik et al., 2002). Los derivados CPT-20-O-acil de aminoácidos se prepararon adaptando un método publicado (Vishnuvajjala et al., Patente de Estados Unidos N° 4,943,579). Los precursores de azida de CL1-SN-38, CL2-SN-38 y CL3-SN-38 mostrados en los Esquemas 1-3 se han descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos correspondiente a la Solicitud de Patente de Estados Unidos provisional N° de Serie 60/885.325, presentada el 17 de enero de 2007. Las abreviaturas usadas a continuación son: DCC, diciclohexilcarbodiimida; NHS, N-hidroxisuccinimida, DMAP, 4-dimetilaminopiridina; PEG, polietilenglicol. La cromatografía ultrarrápida se realizó con gel de sílice de 230-400 mesh y elución en gradiente de metanol-diclorometano. La HPLC de fase inversa se realizó con una columna HPLC C18 de 7,8 x 300 mm, equipada con un filtro de precolumna, y usando el gradiente de solvente de 100% de solvente A al 100% de solvente B en 10 minutos a un caudal de 3 ml por minuto y manteniendo al 100% de solvente B a un caudal de 4,5 ml por minuto durante 5 o 10 minutos. El solvente A era acetato de amonio acuoso al 0,3%, pH 4,46 mientras que el solvente B era acetonitrilo-acetato de amonio acuoso 9:1 (0,3%), pH 4,46. La HPLC se monitorizó mediante un detector de absorbancia en línea doble ajustado a 360 nm y 254 nm.

Ejemplo 1: Preparación de CL1-SN-38

El CL1-SN-38 se representa en el Esquema-1. El precursor de azida de CL1-SN-38 representado en el esquema se ha descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos correspondiente a la Solicitud provisional de Patente de Estados Unidos N° de serie 60/885.325, presentada el 17 de enero de 2007. El reactivo, concretamente 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida, se preparó haciendo reaccionar 0,107 g de SMCC y 0,021 ml de proparilamina (0,018 g; 1,01 equiv.) en diclorometano usando 1,1 equiv. de diisopropiletilamina. Después de 1 h, se eliminó el solvente y el producto se pasó por una columna de gel de sílice y se eluyó con una mezcla 80:20

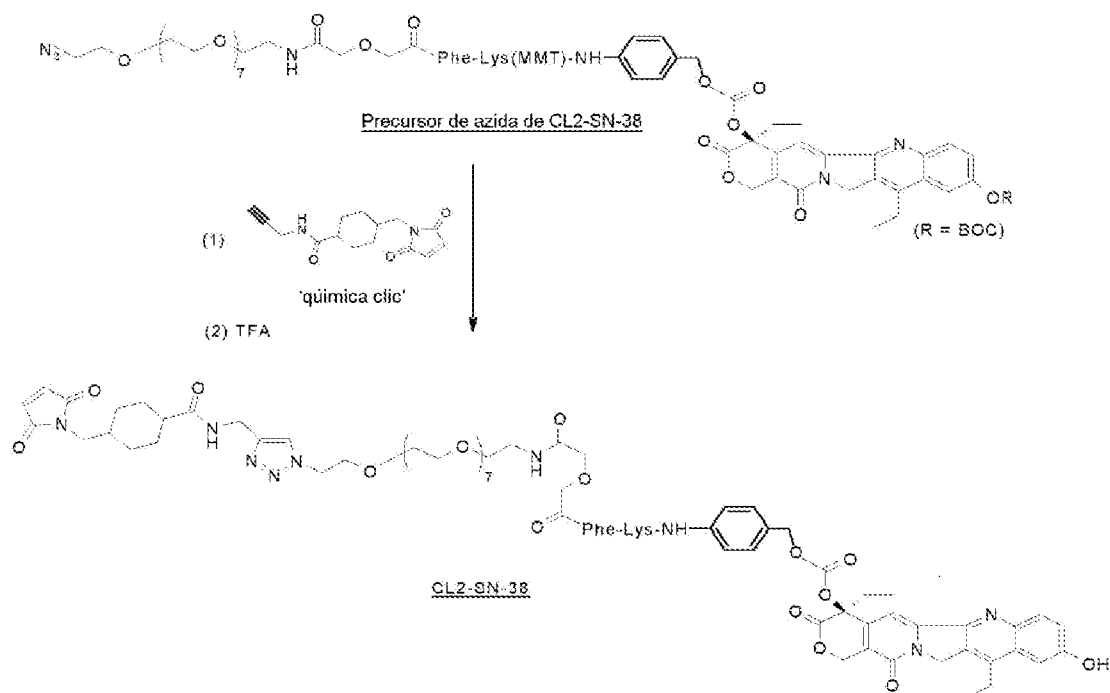
de etilacetato-hexano para obtener 83 mg del producto (polvo incoloro). El espectro de masas por electropulverización mostró picos a m/e 275 (M+H) y un pico base a m/e 192 en el modo de iones positivos, consistente con la estructura calculada para $C_{15}H_{18}N_2O_3$: 275.1390 (M+H), encontrado: 275.1394 (masa exacta). Se añadió una solución del precursor de azida (0,208 g) en DMSO (0,5 ml) al reactivo acetilénico (0,173 g; 3 equiv.), y más DMSO (1.5 ml), seguido de 1 ml de agua, sulfato cúprico acuoso 0,05 M (0,21 ml; 0,05 equiv. con respecto a la azida) y ascorbato sódico acuoso 0,5 M (0,21 ml; 0,5 equiv. con respecto a la azida). La solución algo turbia se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los solventes se eliminaron a alto vacío y el material gomoso residual se purificó por cromatografía ultrarrápida usando elución en gradiente de metanol-diclorometano (0-8%). El producto, CL1-SN-38, se obtuvo con un 65% de rendimiento. HPLC en fase inversa (método 1): tiempo de ret. 9,55 min. El espectro de masas por electropulverización (modo de iones positivos) mostró un pico a m/e 1283 (M+Na), consistente con la estructura esperada. Calculado para $C_{61}H_{81}N_9O_{20}$: 1260.5670 (M+H) y 1282.5490 (M+Na); encontrado 1260.5688 (M+H) y 1282.5491 (M+Na).

Esquema 1

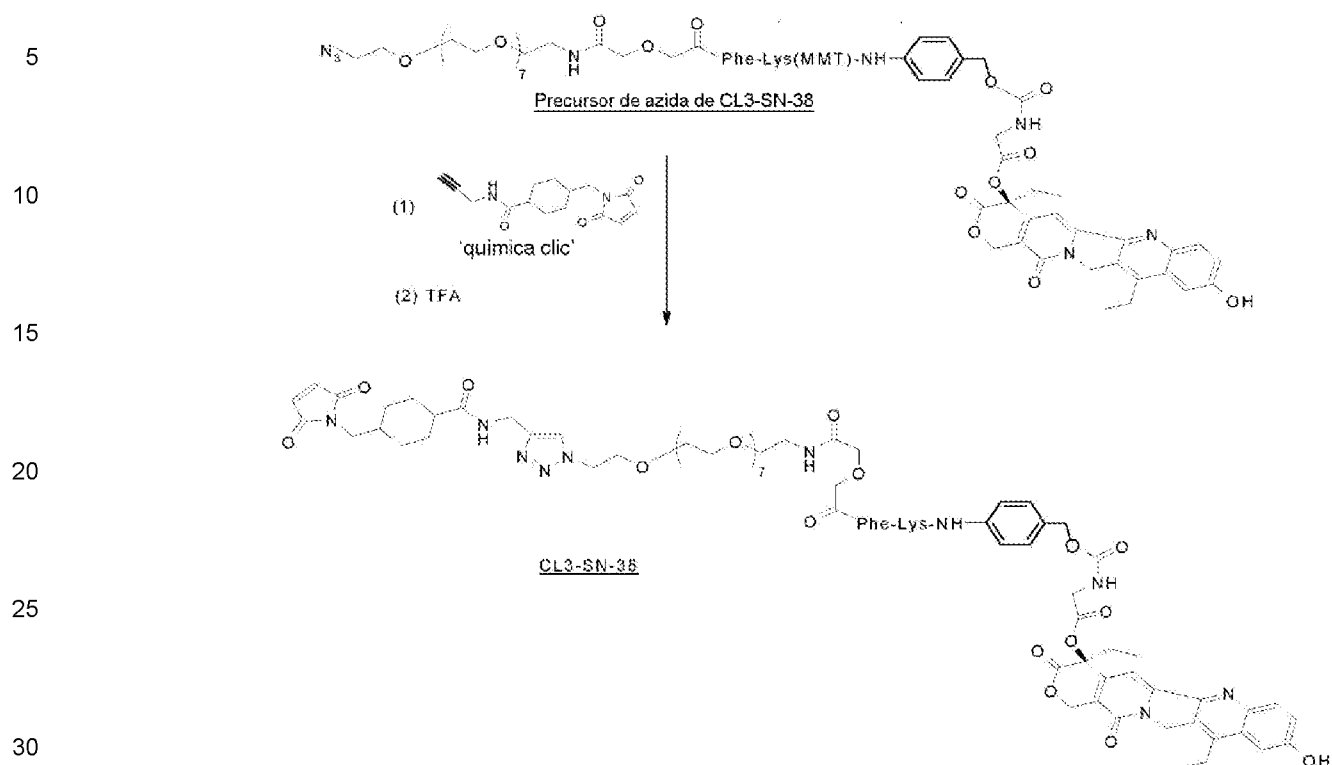


Ejemplo 2: Preparación de CL2-SN-38

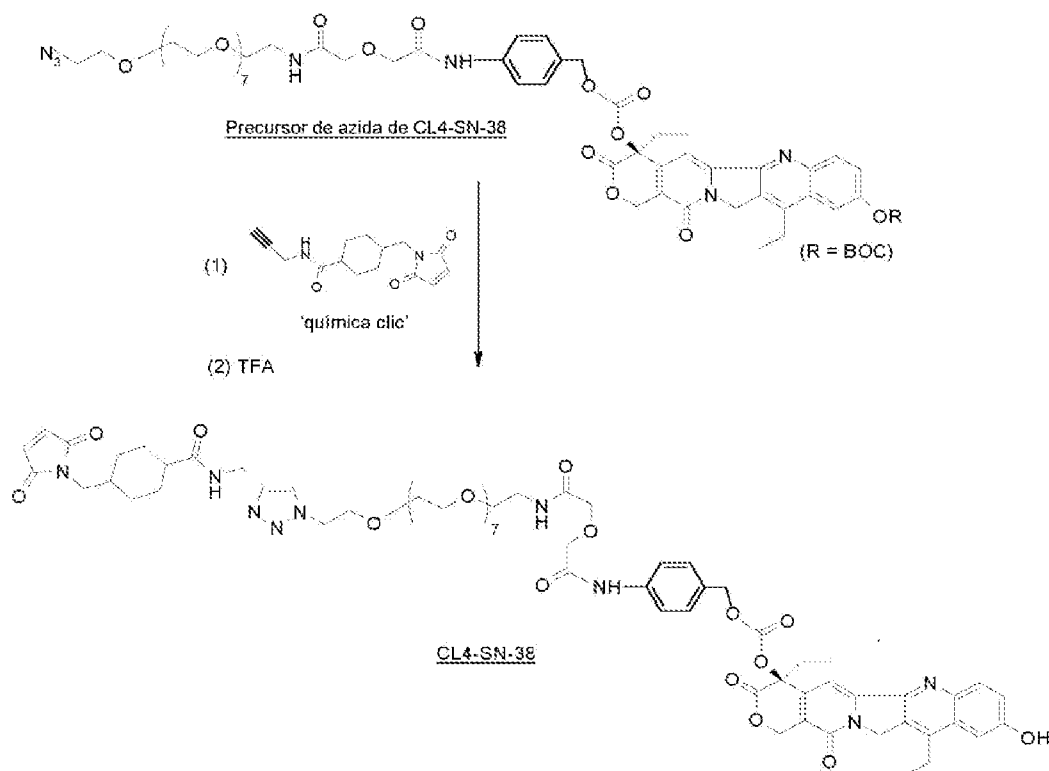
La síntesis se muestra esquemáticamente en el Esquema-2. El precursor de azida de CL2-SN-38 mostrado en el esquema se ha descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos correspondiente a la Solicitud de Patente provisional de Estados Unidos N° de serie 60/885.325, presentada el 17 de enero de 2007. El acoplamiento por 'química de clic' del precursor de azida que se muestra a continuación con el producto acetilénico descrito en el Ejemplo 1 se llevó a cabo de la siguiente manera. La azida (0,22 g, 0,127 mmol) y el reactivo acetilénico (0,105 g, 0,38 mmol) se mezclaron en 3 ml de DMSO y 0,8 ml de agua. Se añadió bromuro cuproso sólido (0,036 g, 2 equiv.) y la mezcla heterogénea se agitó durante 10 min. Se añadió más agua (0,7 ml) y la reacción continuó durante 40 min. Se eliminaron los solventes y el producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida usando elución de gradiente de metanol-diclorometano (2-8%). El producto se obtuvo con un 47% de rendimiento. HPLC en fase inversa (método 1): tiempo de ret. 13,35 min. El espectro de masas por electropulverización (modo de iones positivos) mostró un pico a m/e 2022 (M+Na) consistente con la estructura. Calculado para $C_{107}H_{130}N_{12}O_{26}$: 1999.9292 (M+H) y 2021.9111 (M+Na); encontrado 1999.9292 (M+H) y 2021.9114 (M+Na). El producto se sometió a un tratamiento de corta duración con cóctel de desprotección (ácido trifluoroacético [TFA] 2 ml, diclorometano 0,5 ml, anisol 0,12 ml y agua 0,06 ml). Purificación del producto bruto, después de eliminar el TFA y los solventes, se llevó a cabo mediante cromatografía ultrarrápida usando elución en gradiente de metanol-diclorometano (5% a 18%). El producto, CL2-SN-38, tuvo un tiempo de ret. de HPLC de 10,06 min. Rendimiento: 56%. El espectro de masas por electropulverización (modo de iones positivos) mostró picos a m/e 1628 (M+H) y 1650 (M+Na), consistentes con la estructura. Calculado para $C_{82}H_{106}N_{12}O_{23}$: 627.7566 (M+H) y 1649.7386 (M+Na); encontrado 1627.7585 (M+H) y 1649.7400 (M+Na).

Esquema 2**Ejemplo 3: Preparación de CL3-SN-38**

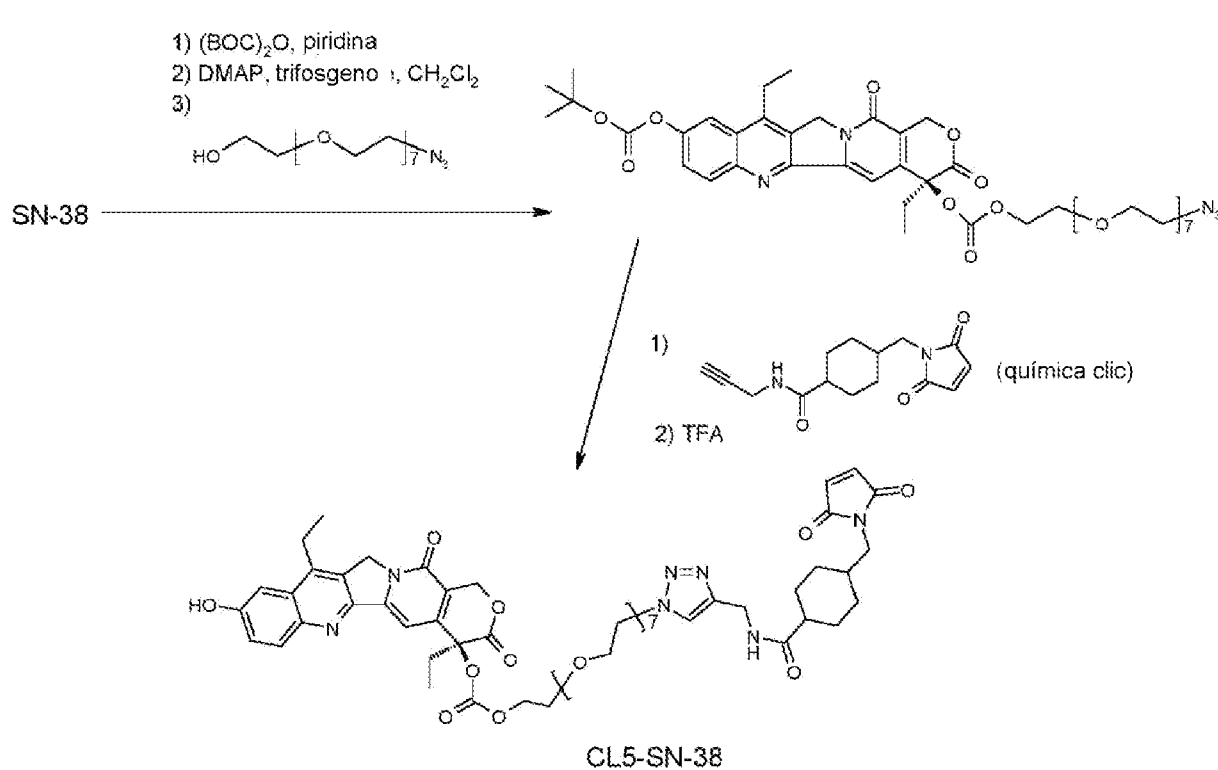
El precursor de azida de CL3-SN-38 (mostrado en el esquema 3 a continuación) se ha descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos correspondiente a la Solicitud de Patente provisional de Estados Unidos N° de serie 60/885.325, presentada el 17 de enero de 2007. El acoplamiento por 'química de clic' del precursor de azida que se muestra a continuación con el producto acetilénico descrito en el Ejemplo 1 se llevó a cabo de la siguiente manera. La azida (0,05 g, 0,03 mmol) y el reactivo acetilénico (0,024 g, 0,087 mmol) se mezclaron en 1 ml de DMSO y 1 ml de agua. Se añadió bromuro cuproso sólido (0,0045 g, 1equiv.) y la mezcla heterogénea se agitó durante 1 hora. El producto bruto se precipitó por dilución con agua y se purificó por cromatografía ultrarrápida usando el gradiente de metanol-diclorometano (2-10%). El producto se obtuvo con un 76% de rendimiento. HPLC en fase inversa (método 1): tiempo de ret. 11,65 min. El espectro de masas por electropulverización (modo de iones positivos) mostró un pico a m/e 1957 ($M+H$), consistente con la estructura. Calculado para $C_{104}H_{125}N_{13}O_{25}$: 1956.8982 ($M+H$) y 1978.8801 ($M+Na$); encontrado 1956.8926 ($M+H$) y 1978.8711 ($M+Na$). El producto se sometió a un tratamiento de corta duración con cóctel de desprotección (ácido trifluoroacético [TFA] 2 ml, diclorometano 0,5 ml, anisol 0,12 ml y agua 0,06 ml). La purificación del producto bruto, después de eliminar el TFA y los solventes, se llevó a cabo por precipitación en éter etílico. El producto, CL3-SN-38, tuvo un tiempo de ret. de HPLC de 9,81 min. Rendimiento: 90%. El espectro de masas por electropulverización (modo de iones positivos) mostró picos a m/e 1685 ($M+H$) y 1707 ($M+Na$), consistentes con la estructura. Calculado para $C_{84}H_{109}N_{13}O_{24}$: 1684.7781 ($M+H$) y 1706.7600 ($M+Na$); encontrado 1684.7778 ($M+H$) y 1706.7611 ($M+Na$).

Esquema 3**Ejemplo 4: Preparación de CL4-SN-38**

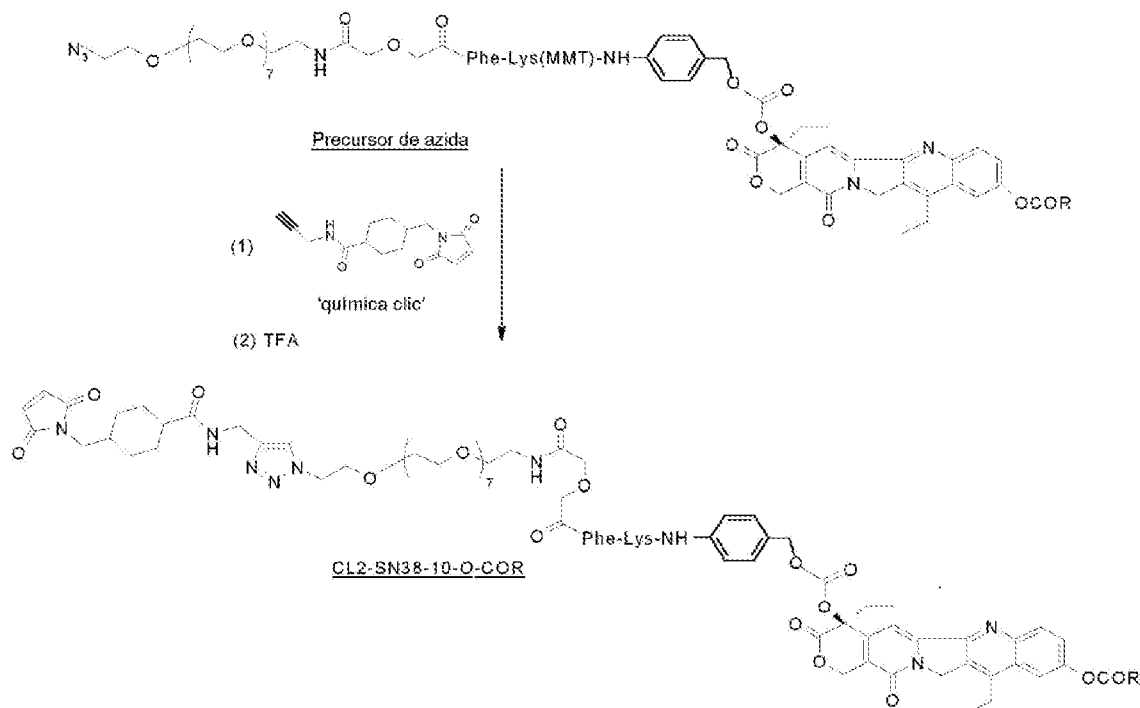
35 La preparación se muestra esquemáticamente en el esquema 4. El O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol disponible comercialmente se activó con NHS, DCC y una cantidad catalítica de DMAP, y se hizo reaccionar con alcohol *p*-aminobezílico. El producto purificado se hizo reaccionar con 10-O-BOC-SN38-20-O-cloroformiato de la manera descrita para la preparación de CL2-SN-38 del Ejemplo 2. El producto purificado, obtenido en un 48% de rendimiento, tuvo un tiempo de ret. de HPLC de 12,11 min. El espectro de masas por electropulverización mostró m/e a 1179 (M+H). Calculado para $C_{57}H_{75}N_7O_{20}$: 1178.5139 (M+H) y 1200.4959 (M+Na); encontrado 1178.5138 (M+H) y 1200.4944 (M+Na). El precursor de azida (0,14 g) y el reactivo acetilénico (0,1 g, 3 equiv) se mezclaron en 3 ml de DMSO y 1 ml de agua. Se añadió bromuro cuproso sólido (0,05 g, 3 equiv.) y la mezcla heterogénea se agitó durante 10 min. Se añadió más agua (0,5 ml) y la reacción continuó durante 30 min. Se eliminaron los solventes y el producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida usando elución en gradiente de metanol-diclorometano (0-8%). El producto obtenido (0,135 g; 84% de rendimiento) tuvo un tiempo de ret. de HPLC de 11,5 min. Calculado para $C_{72}H_{93}N_9O_{23}$: 1452.6457 (M+H) y 1474.6276 (M+Na); encontrado 1452.6429 (M+H) y 1474.6262 (M+Na). El producto se sometió a tratamiento de corta duración con cóctel de desprotección como se describe en el Ejemplo 2. La purificación del producto bruto, después de eliminar el TFA y los solventes, se llevó a cabo mediante cromatografía ultrarrápida usando elución en gradiente de metanol-diclorometano (del 1% al 8%). El producto, CL4-SN-38, tuvo un tiempo de ret. de HPLC de 10,31 min. Rendimiento: 56%. El espectro de masas por electropulverización (modo de iones positivos) mostró picos a m/e 1353 (M+H), consistentes con la estructura. Calculado para $C_{67}H_{85}N_9O_{21}$: 1352.5932 (M+H) y 1374.5752 (M+Na); encontrado 1352.5907 (M+H) y 1374.5729 (M+Na).

Esquema 4**Ejemplo 5: Preparación de CL5-SN-38**

El precursor de azida para este sustrato se preparó en 3 pasos a partir de SN-38, implicando la protección del grupo 10-OH como derivado de 10-O-BOC, seguido de la formación de 20-O-cloroformiato y la reacción con O-(2-azidoetil)heptaetilenglicol. El producto azido-SN-38 se purificó por cromatografía ultrarrápida de la manera descrita en el Ejemplo 2. El producto, con tiempo de ret. por HPLC: 12,4 min, también contenía ~ 8,5% de material de partida no eliminado. El espectro de masas de electropulverización de este material mostró m/e a 915 (M+H). Calculado para $C_{44}H_{59}N_5O_{16}$: 914.4036 (M+H); encontrado 914.4034 (M+H). El acoplamiento por química de clic de este derivado azido con el reactivo acetilénico del Ejemplo 1 se llevó a cabo con 3 equivalentes de este último y 3 equivalentes de bromuro cuproso en una mezcla de DMSO y agua (1:1 v/v), y se purificó por cromatografía ultrarrápida. Rendimiento: 81%. Tiempo de ret. de HPLC: 11,62 min. El espectro de masas por electropulverización (modo de iones positivos) mostró picos a m/e 1189 (M+H), consistentes con la estructura. Calculado para $C_{59}H_{77}N_7O_{19}$: 1188.5354 (M+H); encontrado 1188.5323 (M+H). La desprotección con ácido trifluoroacético en las condiciones descritas en el Ejemplo 2, seguido de purificación por cromatografía ultrarrápida, proporcionó el producto del título (CL5-SN-38). HPLC: tiempo de ret. 10,28 min. El espectro de masas por electropulverización (modo de iones positivos) mostró picos a m/e 1089 (M+H), consistentes con la estructura. Calculado para $C_{54}H_{69}N_7O_{17}$: 1088.4822 (M+H) y 1110.4642 (M+Na); encontrado 1088.4799 (M+H) y 1110.4632 (M+Na).

Esquema 5**Ejemplo 6: Preparaciones de CL1-SN-38-10-O-COR, CL2-SN-38-10-O-COR, CL3-SN-38-10-O-COR, CL4-SN-38-10-O-COR y CL5-SN-38-10-O-COR**

Este ejemplo muestra que el grupo 10-OH de SN-38 está protegido como un carbonato o un éster, en lugar de como 'BOC', de tal manera que el producto final está listo para la conjugación con anticuerpos sin necesidad de desproteger el grupo protector 10-OH. Este aspecto se ha descrito en el párrafo 053. Este grupo se desprotege fácilmente en condiciones de pH fisiológico después de la administración in vivo del conjugado proteico. En el Esquema-6, 'R' puede ser un alquilo sustituido como (CH₂)_n-N(CH₃)₂ donde n es 2-10, o alquilo simple como (CH₂)_n-CH₃ donde n es 2-10, o puede ser una fracción alcoxi como 'CH₃-(CH₂)_n-O-' o una fracción alcoxi sustituida como O-(CH₂)_n-N(CH₃)₂ donde n es 2-10 y donde el grupo amino terminal está opcionalmente en forma de sal cuaternaria para mejorar la solubilidad acuosa, o es un residuo metoxi PEG. En la versión más simple de esta última categoría, R = '-O-(CH₂)₂-OCH₃'. Estos derivados 10-hidroxi se preparan fácilmente por tratamiento con el cloroformiato del reactivo elegido, si el derivado final ha de ser un carbonato. Típicamente, la camptotecina que contiene 10-hidroxi como SN-38 está tratada con un equivalente molar del cloroformiato 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 de ácido del reactivo elegido. En cada caso, se sigue la secuencia de pasos, después de la derivatización de 10-hidroxi, descrita en los Ejemplos 1-5 para generar versiones 10-protégidas de CL1-SN-38, CL2-SN-38, CL3-SN-38, CL4-SN-38 y CL5-SN-38, respectivamente. Para el caso más sencillo de que R sea etoxi, el primer paso es la conversión de SN-38 a su carbonato de 10-O-etilo mediante tratamiento con cloroformiato de etilo en dimetilformamida usando trietilamina como base.

Esquema 6**Ejemplo 7: Conjugación de productos intermedios de SN-38 que contienen maleimida a anticuerpos ligeramente reducidos: unión a la región entre cadenas de MABs.**

En estos estudios se usaron el MAb humanizado anti-CEACAM5, hMN14, el MAb humanizado anti-CD22, hLL2, el MAb humanizado anti-CD20, hA20, el MAb humanizado anti-EGP-1, hRS7, y el MAb humanizado anti-MUC1, hPAM4. Cada anticuerpo se redujo con ditioneitol (DTT), usado en un exceso molar de 50 a 70 veces, en 40 mM PBS, pH 7,4, conteniendo 5,4 mM EDTA, a 37° C (baño) durante 45 min. El producto reducido se purificó en una columna de exclusión por tamaño centrifugada y se intercambi6 en tamp6n con 75 mM de acetato s6dico-1 mM de EDTA. El contenido de tiol se determin6 mediante el ensayo de Ellman, y estaba en el intervalo de 6,5 a 8,5 SH/IgG. Alternativamente, los anticuerpos se reducen con tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) en tamp6n fosfato a pH en el intervalo de 5-7, seguido de conjugaci6n *in situ*. El MAb reducido se hizo reaccionar con un exceso molar de ~10 a 15 veces de 'CL1-SN-38' del Ejemplo 1, o 'CL2-SN-38' del Ejemplo 2, o 'CL3-SN-38' del Ejemplo 3, o 'CL4-SN-38' del Ejemplo 4, o 'CL5-SN-38' del Ejemplo 5, o 'CL2-SN-38-10-O-CO₂Et' del Ejemplo 6, usando DMSO al 10% v/v como cosolvente, y se incub6 durante 20 min a temperatura ambiente. El conjugado se purific6 por centrifugaci6n SEC, paso a trav6s de una columna hidr6foba, y finalmente por ultrafiltraci6n-diafiltraci6n. El producto se ensay6 para SN-38 por absorbancia a 366 nm y correlacionando con valores est6ndar, mientras que la concentraci6n de prote6na se dedujo de la absorbancia a 280 nm, corregida por el desbordamiento de la absorbancia de SN-38 a esta longitud de onda. De esta manera, se determinaron las relaciones de sustituci6n SN-38/MAB. Los conjugados purificados se almacenaron como formulaciones liofilizadas en viales de vidrio, se taparon al vac6o y se guardaron en un congelador a -20° C. En la Tabla 2 se muestran las relaciones de sustituci6n molar (MSR) de SN-38 obtenidas para algunos de estos conjugados, que t6picamente se encuentran en el intervalo de 5 a 7 en vista del modo de conjugaci6n.

Tabla 2: Relaciones de sustituci6n molar SN-38/MAB (MSR) en algunos conjugados

MAB	Conjugado	MSR
hMN-14	hMN-14-[CL1-SN-38], usando el conector de f6rmaco del Ejemplo 1	7.7
	hMN-14-[CL2-SN-38], usando el conector de f6rmaco del Ejemplo 2	6.8
	hMN-14-[CL3-SN-38], usando el conector de f6rmaco del Ejemplo 3.	5.5
	hMN-14-[CL5-SN-38], usando el conector de f6rmaco del Ejemplo 5	6.9
hRS7	hRS7-CL1-SN-38 usando el conector de f6rmaco del Ejemplo 1	5.3
	hRS7-CL2-SN-38, usando el conector de f6rmaco del Ejemplo 2	6.3
	hRS7-CL3-SN-38, usando el conector de f6rmaco del Ejemplo 3	5.1

(continuación)

MAB	Conjugado	MSR
hPAM-4	hPAM-4-[CL2-SN-38], usando el conector de fármaco del Ejemplo 2	5.7
hLL2	hLL2-CL1-SN-38, usando el conector de fármaco del Ejemplo 1	7.4
	hLL2-CL2-SN-38, usando el conector de fármaco del Ejemplo 2	6.4
hA20	hA20-CL2-SN-38, usando el conector de fármaco del Ejemplo 2	6.1

Ejemplo 8: Estabilidades hidrolíticas *in vitro* de diferentes conjugados hMAB-SN-38: Ajuste fino de los perfiles de estabilidad variando el conector y modificando la posición 10-hidroxi

Se examinaron las estabilidades *in vitro* de los conjugados SN-38 del anticuerpo anti-CEACAM5, hMN-14, derivados de CL1-SN-38 del Ejemplo 1, CL2-SN-38 del Ejemplo 2, CL3-SN-38 del Ejemplo 3, CL4-SN-38 del Ejemplo 4, CL5-SN-38 del Ejemplo 5, y el análogo 10-O-etoxicarbonilo de CL2-SN-38, como se describe en el Ejemplo 6, en 40 mM PBS a 37° C. A intervalos periódicos, se retiraron alícuotas, se añadió una cantidad conocida de 10-hidroxycamptotecina usada como estándar interno, y el material se extrajo mediante precipitación de proteínas con acetonitrilo, y extracción de SN-38 (disociado del anticuerpo) mediante extracción con cloroformo. Se analizaron volúmenes fijos de los extractos mediante HPLC de fase inversa, cuantificando para SN-38 mediante detección por fluorescencia de los picos de HPLC. Las relaciones de picos de SN-38/estándar interno se correlacionaron con la curva estándar de SN-38, generada trazando las relaciones de picos de SN-38/estándar interno en función de la concentración de SN-38. Los gráficos de la cinética de disociación de SN-38 se generaron usando el software estándar Prism®. La **FIG. 1** muestra que el impedimento estérico alrededor de la posición 20-carbonato o 20-éster en SN-38 aumenta la estabilidad hidrolítica de los conjugados de anticuerpos correspondientes. Además, la protección de la posición 10-hidroxi de SN-38, como derivado etoxicarbonilo, por ejemplo (como se muestra en este Ejemplo), mejora significativamente la estabilidad hidrolítica. En el párrafo 053 se enumeran ejemplos de grupos protectores 10-hidroxi. Por tanto, la modulación de los perfiles de estabilidad de los conjugados de camptotecina en general, y de los conjugados de SN-38 en particular, mediante variaciones en el diseño del conector como se describe en estos Ejemplos, es también una realización de la presente invención.

Ejemplo 9: Unión celular *in vitro* y citotoxicidad de los conjugados anticuerpo-SN-38 en diferentes líneas celulares.

Se realizaron estudios *in vitro* usando células de carcinoma de colon humano LoVo y conjugados de anticuerpos anti-CEACAM5 de SN-38 [hMN-14-(CL1-SN-38), hMN-14-(CL2-SN-38) y hMN-14-(CL3-SN38)], la línea celular pancreática humana CaPan-1 (para la que es positivo el anticuerpo anti-EGP-1 hRS7) y la línea celular de adenocarcinoma de pulmón Calu-3 y conjugados de hRS7. En estas dos últimas líneas celulares, los conjugados usados fueron hRS7-CL1-SN-38, hRS7-CL2-SN-38 y hRS7-CL3-SN-38. Las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Para los ensayos de unión celular, se usaron anticuerpos no modificados como controles positivos. En los ensayos de inhibición del crecimiento (citotoxicidad), se usó como control positivo el fármaco SN-38 libre. La unión celular a líneas celulares de cultivo tisular positivas al antígeno se realizó mediante ensayos ELISA de unión indirecta a la superficie celular. Para los estudios de inhibición del crecimiento, se recogieron las células y se sembraron en placas de 96 pocillos (25.000 células/pocillo). Se añadieron 20 µl de soluciones diluidas en serie de conjugados o controles a cada pocillo hasta una concentración final de 0-7 µM de concentración final de SN-38 equivalente, y se incubaron a 37° C. El tiempo total de incubación fue de 96 h. Para determinar las curvas de respuesta a la dosis se usó el ensayo de reducción del colorante MTS, y se determinaron las concentraciones efectivas de EC₅₀ usando el software PrismPad® (Advanced Graphics Software, Encinitas, CA). De manera similar, para la evaluación de los conjugados SN-38 del anticuerpo anti MUC-1, hPAM4, que es específico para esta línea celular se usó la línea celular pancreática humana Capan-1. Esto demuestra la conservación de la unión celular y la citotoxicidad de los conjugados de SN-38 de hPAM-4. De manera similar, las uniones celulares y citotoxicidades de los conjugados CL4-SN-38, CL5-SN-38 y análogos de 10-etoxicarbonilo de los conjugados CL1-SN-38, CL2-SN-38, CL3-SN-38, CL4-SN-38 y CL5-SN-38 de estos anticuerpos muestran uniones celulares e inhibiciones del crecimiento cuando se examinan en las líneas celulares para las que son específicos los anticuerpos.

Las siguientes figuras demuestran la capacidad de unión a antígenos y de inhibición del crecimiento de conjugados ejemplares. La **FIG. 2** muestra la unión de varios inmunoconjugados de hMN14-SN38 a la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano LoVo. Los conjugados CL-1, CL-2 y CL3 de SN38 a hMN14 mostraron afinidades de unión (valores K_d) que eran comparables a la IgG hMN-14 no conjugada. La **FIG. 3** muestra la citotoxicidad *in vitro* de los inmunoconjugados hMN14-SN38 en la línea celular LoVo. Los conjugados de SN38 CL1, CL2 y CL3 de hMN14 mostraron citotoxicidades comparables (ejemplificadas por los valores de IC₅₀) con SN-38 libre. Los expertos en la técnica se darán cuenta de que *in vivo* la citotoxicidad del SN-38 libre estará limitada por su toxicidad sistémica, mientras que la administración dirigida por anticuerpos del SN-38 conjugado reducirá la toxicidad sistémica y permitirá administrar dosis eficaces más altas de SN-38 a las células o tejidos diana. La **FIG. 4** ilustra la citotoxicidad contra la línea celular de adenocarcinoma de pulmón Calu-3. Los conjugados CL1, CL2 y CL3 de hRS7 mostraron valores de EC₅₀ comparables a los de SN38 libre.

Ejemplo 10: Terapia *in vivo* de metástasis pulmonares de tumores colónicos humanos GW-39 en ratones desnudos usando hMN-14-[CL1-SN-38] y hMN-14-[CL2-SN-38] con controles apropiados.

Se estableció un modelo metastásico pulmonar de carcinoma colónico en ratones desnudos mediante inyección i.v. de suspensión de tumor colónico humano GW-39, y se inició la terapia 14 días después. Se inyectaron conjugados específicos de anticuerpos antiCEACAM5, hMN14-CL1-SN-38 y hMN14-CL2-SN-38, así como conjugados de control MAb anti-CD22 no selectivos, hLL2-CL1-SN-38 y hLL2-CL2-SN38 y mezclas equidosisadas de hMN14 y SN-38 en un programa de dosis de q4dx8, usando diferentes dosis. La FIG. 5 (MSR = relación de sustitución molar SN-38/anticuerpo) muestra los efectos terapéuticos selectivos debidos a los conjugados hMN-14. A dosificaciones equivalentes de 250 µg, los ratones tratados con hMN14-CL1-SN38 o hMN14-CL2-SN38 mostraron una mediana de supervivencia de más de 107 días. Los ratones tratados con los anticuerpos conjugados de control hLL2-CL1-SN38 y hLL2-CL2-SN38, que no se dirigen específicamente a las células cancerígenas de pulmón, mostraron una supervivencia mediana de 56 y 77 días, mientras que los ratones tratados con hMN14 IgG no conjugada y SN38 libre mostraron una supervivencia mediana de 45 días, comparable a la del control salino no tratado de 43,5 días. Se observó claramente un aumento significativo y sorprendente de la eficacia del conjugado anticuerpo-SN38 dirigido a las células cancerígenas, que fue sustancialmente más eficaz que el anticuerpo no conjugado y el agente quimioterapéutico libre por sí solos. También se observó la respuesta a la dosis del efecto terapéutico del anticuerpo conjugado. Estos resultados demuestran la clara superioridad de los conjugados anticuerpo-SN38 en comparación con el efecto combinado del anticuerpo no conjugado y el SN38 libre en el mismo sistema *in vivo* de cáncer de pulmón humano.

Ejemplo 11: Terapia *in vivo* de ratones desnudos portadores de tumores pancreáticos humanos CaPan1 usando hPAM-4-[CL2-SN-38].

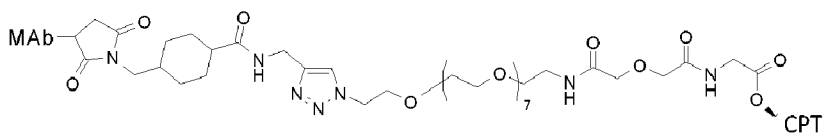
Se estableció un modelo de tumor pancreático s.c. usando células tumorales humanas CaPan1, y una vez que los volúmenes tumorales alcanzaron ~ 0,2 cm³, se inició la terapia usando el conjugado SN-38 de anticuerpo específico, hPAM4, concretamente, hPAM4-CL2-SN-38. Un esquema de dosis de q4dx8 usando la dosis de proteína de 0,5 mg (dosis de fármaco de ~ 0,39 mg de SN-38 conjugado/ kg de peso corporal) mostró un control significativo (tratado frente a no tratado semana-3: $P_{AUC} < 0,01$) del crecimiento tumoral frente a no tratado (FIG. 6). Todos los ratones tratados estuvieron vivos >7 semanas, mientras que todos los ratones no tratados se sacrificaron a las 4½ semanas debido a la carga tumoral. Los ratones tratados con el anticuerpo conjugado hPAM4-CL2-SN38 mostraron un volumen tumoral medio cercano a cero después de 7 semanas (FIG. 6), mientras que los ratones de control puntual tenían un volumen tumoral medio de casi 2,0 cm³ después de 4 semanas. El conjugado de anticuerpo hPAM4-CL2-SN38 fue muy eficaz para reducir la carga tumoral y prolongar la supervivencia en este sistema modelo *in vivo* de cáncer de páncreas humano.

Ejemplo 12: Eliminación de la infección por VIH mediante tratamiento con un conjugado SN-38 de un Mab anti-gp120

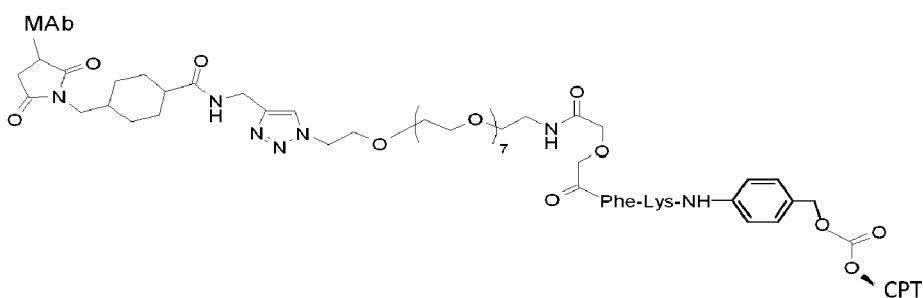
Se reduce un MAb dirigido a la proteína de la envoltura del VIH gp120, anticuerpo anti-gp120 como P4/D10, usando las condiciones descritas en el Ejemplo 7, y el MAb reducido se hace reaccionar con un exceso molar de 20 veces del conector de fármaco CL2-SN-38, que es como se describe para el Ejemplo 2. Se obtiene un conjugado anti-gp120-SN-38 con una sustitución de ~ 8 moléculas de fármaco por anticuerpo. Se realiza un ensayo de inhibición del VIH *in vitro* con dicho conjugado usando varias mezclas de células Jurkat-T no infectadas y células Jurkat-T totalmente infectadas por el VIH (en proporciones de 99,8:2 a 95:5), y tratándolas con diluciones en serie del conjugado, control no específico del conjugado hRS7-CL-SN38, anticuerpo desnudo y suero VIH negativo de 100 a 0,00001 µg/ml. Las células así tratadas se incuban en medio de cultivo RPMI 1640 a 37° C durante siete días y, a continuación, se analiza la inhibición del VIH mediante la prueba ELISA correspondiente. Este experimento muestra una inhibición fuerte y específica de la propagación intercelular del VIH por el conjugado farmacéutico específico. La eficacia *in vivo* se prueba administrando a ratones células isólogas infectadas por el VIH junto con conjugados SN-38 específicos y no específicos. Para ello, se transfieren por vía intraperitoneal esplenocitos murinos primarios infectados por el virus del pseudotipo VIH-1/MuLV a grupos de ratones simultáneamente con la administración del inmunoconjugado. Las células peritoneales se recogen 10 días después. Mientras que se demuestra la presencia de VIH infeccioso en los ratones de control, no se detecta VIH infeccioso en los ratones tratados con 100 µg o menos de conjugado anti-gp120-SN-38. No se observa protección en los ratones tratados con conjugados de control.

REIVINDICACIONES

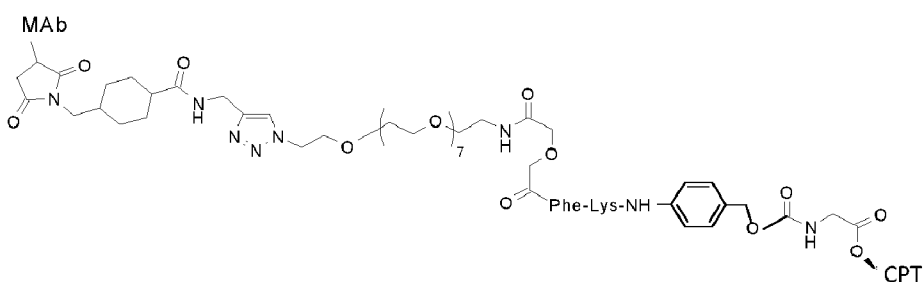
1. Un conjugado de un fármaco de camptotecina (CPT) y una fracción de direccionamiento, en donde el conjugado tiene una fórmula estructural seleccionada del grupo que consiste en MAb-CL1-CPT, MAb-CL2-CPT, MAb-CL3-CPT, MAb-CL4-CPT y MAb-CL5-CPT y tiene una estructura seleccionada de:



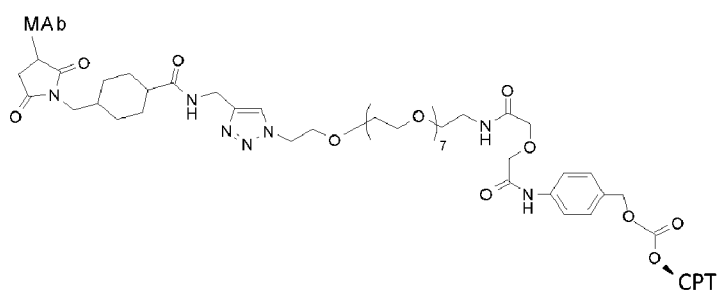
MAb-CL1-CPT



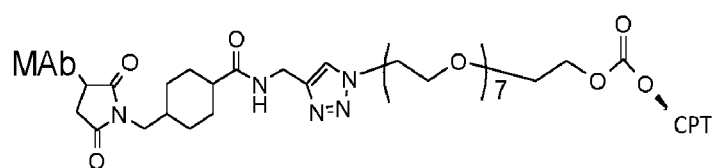
MAb-CL2-CPT



MAb-CL3 -CPT



MAb-CL4-CPT, o



MAb-CL5-CPT en donde el fármaco de CPT se selecciona del grupo que consiste en camptotecina, 10-hidroxi camptotecina, SN-38, topotecán, lurtotecán, 9- aminocamptotecina y 9-nitrocamptotecina; en donde el conector está unido al grupo 20-hidroxilo del fármaco de CPT; y en donde el MAb es un anticuerpo monoclonal (MAb) murino, quimérico, primatizado, humanizado o humano, y dicho anticuerpo está en forma intacta, de fragmento (Fab, Fab',

F(ab)₂, F(ab')₂, o de subfragmento (constructo de cadena sencilla), para su uso en el tratamiento del cáncer.

2. El conjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un antígeno expresado por o asociado a un cáncer.

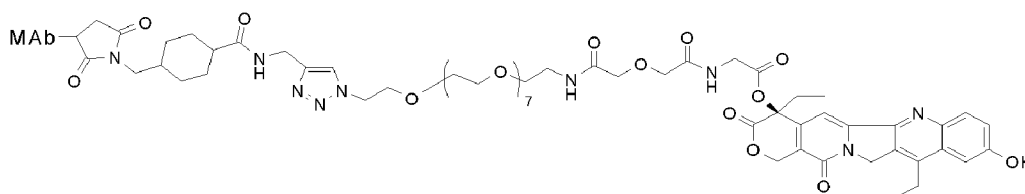
3. El conjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer testicular, leucemia mieloide, linfomas de células B, leucemias de células B, leucemia linfocítica crónica, linfomas de células T, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, mieloma múltiple, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer renal, glioblastoma multiforme, histiocitoma, leucemia mieloide, adenocarcinomas, sarcomas, tumores gliales y carcinoma hepatocelular.

4. El conjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho MAb se selecciona del grupo que consiste en LL1, LL2, RFB4, hA20, 1F5, L243, RS7, PAM-4, MN-3, MN-14, MN-15, Mu-9, AFP-31, L19, G250, J591, CC49, L243, e Immu-31.

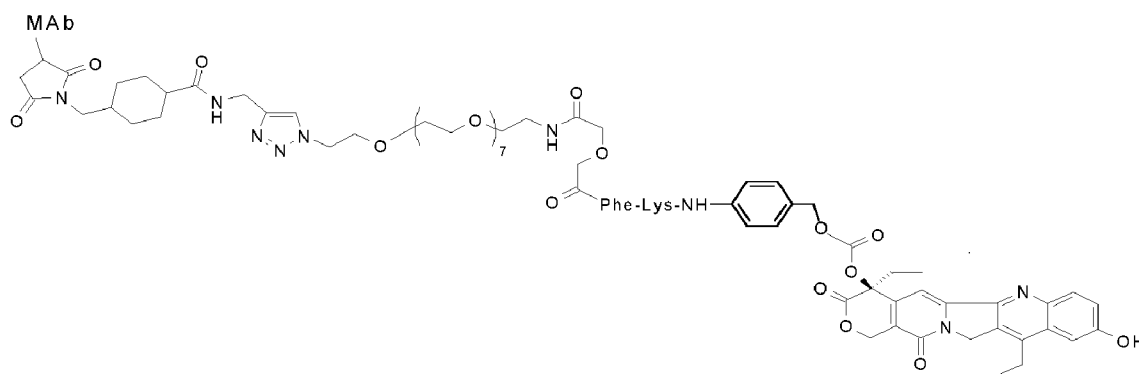
5. El conjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho conector se selecciona del grupo que consiste en CL1, CL2, CL3, CL4 y CL5.

6. El conjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha CPT es SN-38.

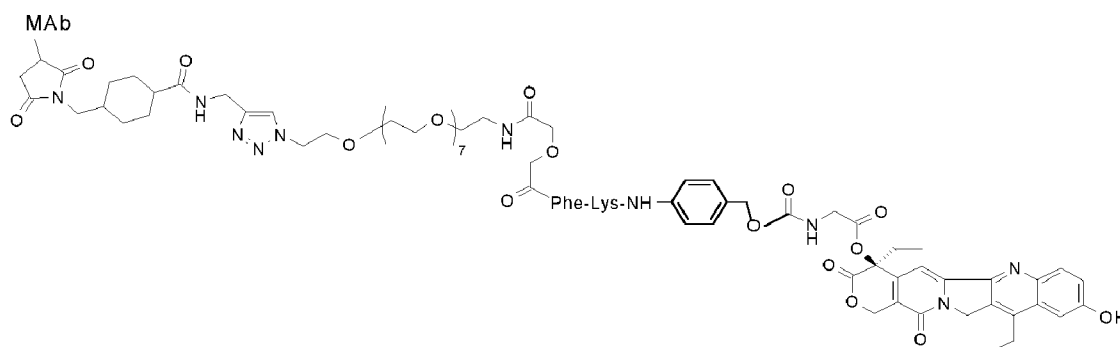
7. El conjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una fórmula estructural seleccionada del grupo que consiste en MAb-CL1-SN-38, MAb-CL2-SN-38, MAb-CL3-SN-38, MAb-CL4-SN-38, MAb-CL5-SN-38 y que tiene una estructura seleccionada de:



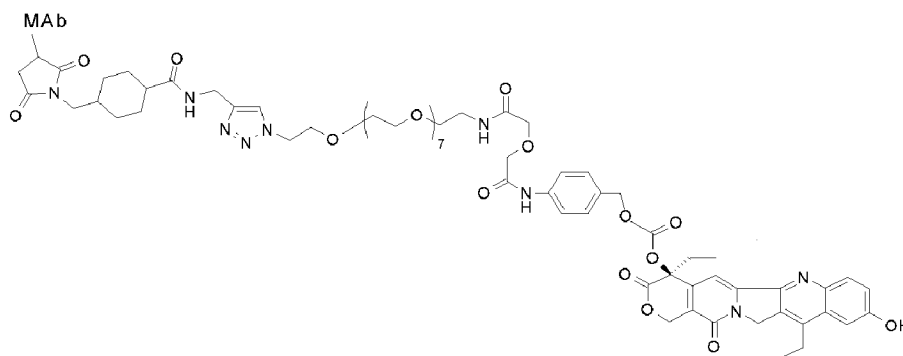
MAb-CL1-SN-38



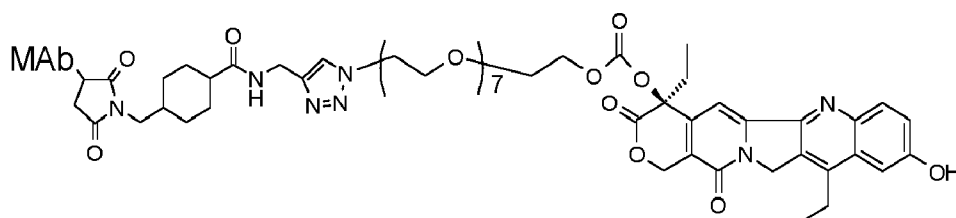
MAb-CL2-SN-38



MAb-CL3-SN-38



MAb-CL4-SN-38, o



MAb-CL5-SN-38.

8. El conjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la posición 10-hidroxi de SN-38 se protege como derivado 10-O-éster o 10-O-carbonato usando una fracción 'COR' en la que el grupo R se selecciona de un residuo de alquilo sustituido como 'N(CH₃)₂-(CH₂)_n-' donde n es 2-10 y en donde el grupo amino terminal está opcionalmente en forma de sal cuaternaria para solubilidad acuosa mejorada, o residuos alquílicos simples como 'CH₃-(CH₂)_n-' donde n es 0-10, o residuos alcoxi como 'CH₃-(CH₂)_n-O-' donde n es 0-10 o 'N(CH₃)₂-(CH₂)_n-O-' donde n es 2-10, o 'R₁O-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₂-CH₂-O-' donde R₁ es etilo o metilo y n es un número entero con valores de 0-10.

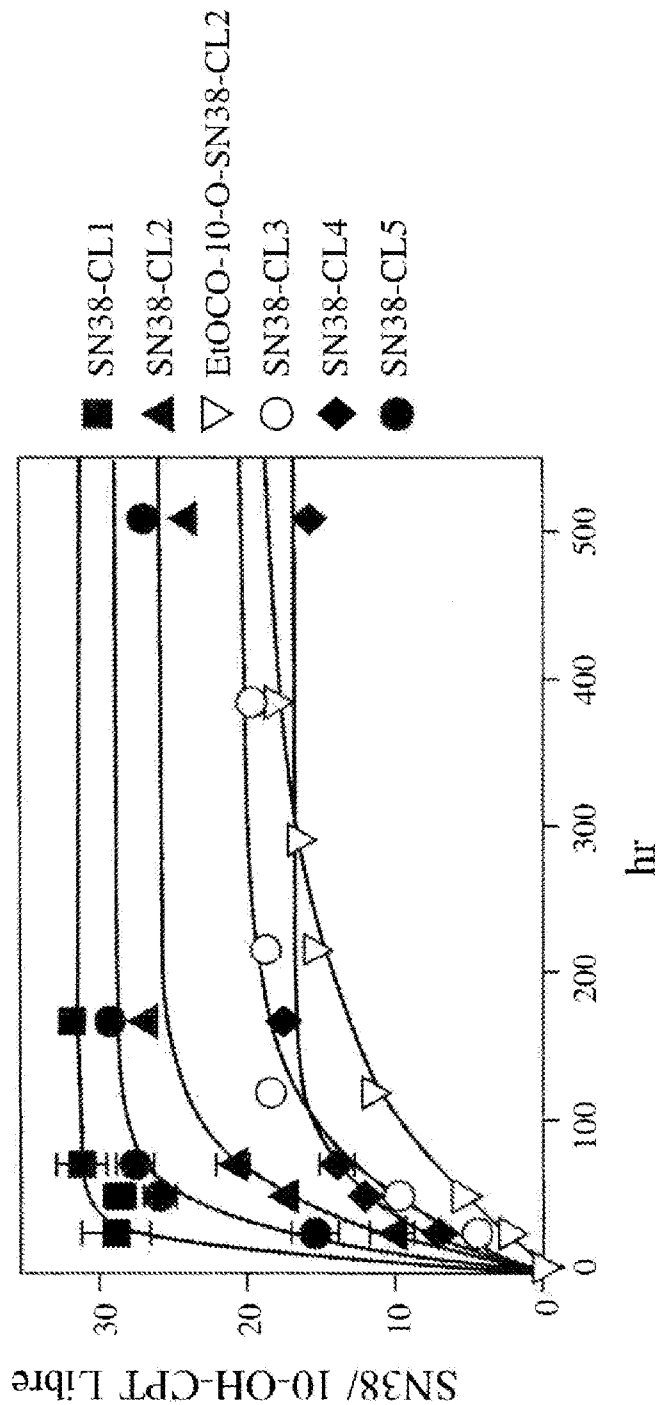
9. El conjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho MAb se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD74, CD22, glicoproteína epitelial-1, antígeno carcinoembrionario (CEA o CD66e), antígeno específico de colon-p, alfa-fetoproteína, CC49, antígeno de membrana específico de la próstata, anhidrasa carbónica IX, HER-2/neu, EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, ILGF, BrE3, CD19, CD20, CD21, CD23, CD33, CD45, CD74, CD80, CEACAM5, CEACAM6, VEGF, fibronectina ED-B, PIGF, antígeno de angiogénesis tumoral, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, gangliósidos, HCG, EGP-2, CD37, HLA-DR, CD30, Ia, A3, A33, Ep-CAM, KS-I, Le(y), S100, PSA, tenascina, receptor de folato, antígenos Thomas-Friedreich, antígenos de necrosis tumoral, Ga 733, IL-2, IL-6, TIOI, MAGE, factor de inhibición de la migración (MIF), un antígeno que se une por L243, un antígeno que se une por PAM4, CD66a (BGP), CD66b (CGM6), CD66c (NCA), CD66d (CGMI), TAC y combinaciones de los mismos.

10. El conjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho MAb es multiespecífico, con múltiples brazos de unión para dirigirse a por lo menos a dos antígenos o epítopos diferentes contenidos en la célula o patógeno diana, y uno o más brazos de direccionamiento se conjugan con CPT.

11. El conjugado para el uso de la reivindicación 1, en donde el MAb es una proteína de fusión.

12. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, la composición comprendiendo un conjugado como se define en la reivindicación 1 y una o más de otras modalidades terapéuticas seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos no conjugados, anticuerpos radiomarcados, anticuerpos conjugados con fármacos, anticuerpos conjugados con toxinas, terapia génica, quimioterapia, péptidos terapéuticos, oligonucleótidos, radioterapia localizada, cirugía y terapia de ARN de interferencia.

FIG. 1



	SN38-CL1	SN38-CL2	EtOCO-10-O-SN38-CL2	SN38-CL3	SN38-CL4	SN38-CL5
YMAX	31.33	25.92	19.14	20.27	16.91	28.87
K	0.08034	0.02303	0.007045	0.01421	0.02508	0.03698
Vida media	8.627	30.09	98.39	48.77	27.63	18.74

FIG. 2

Unión celular de varios inmunocombinados de hMN14-SN38 en una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humana (LoVo)

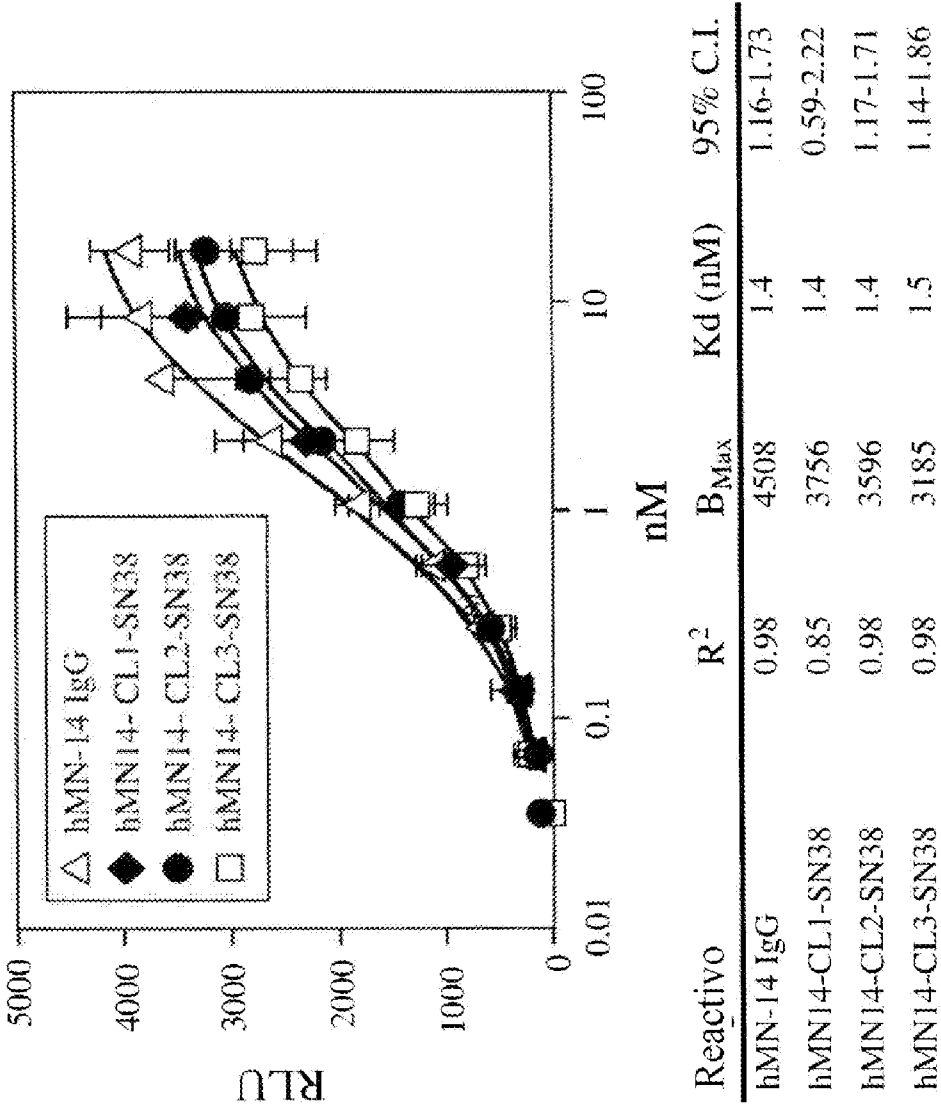


FIG. 3

Citotoxicidad in vitro de varios inmunocombinados hMN14-SN38 en una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano (LoVo) (Ensayo de 96 horas) (07/12/07-07-07/16/07)

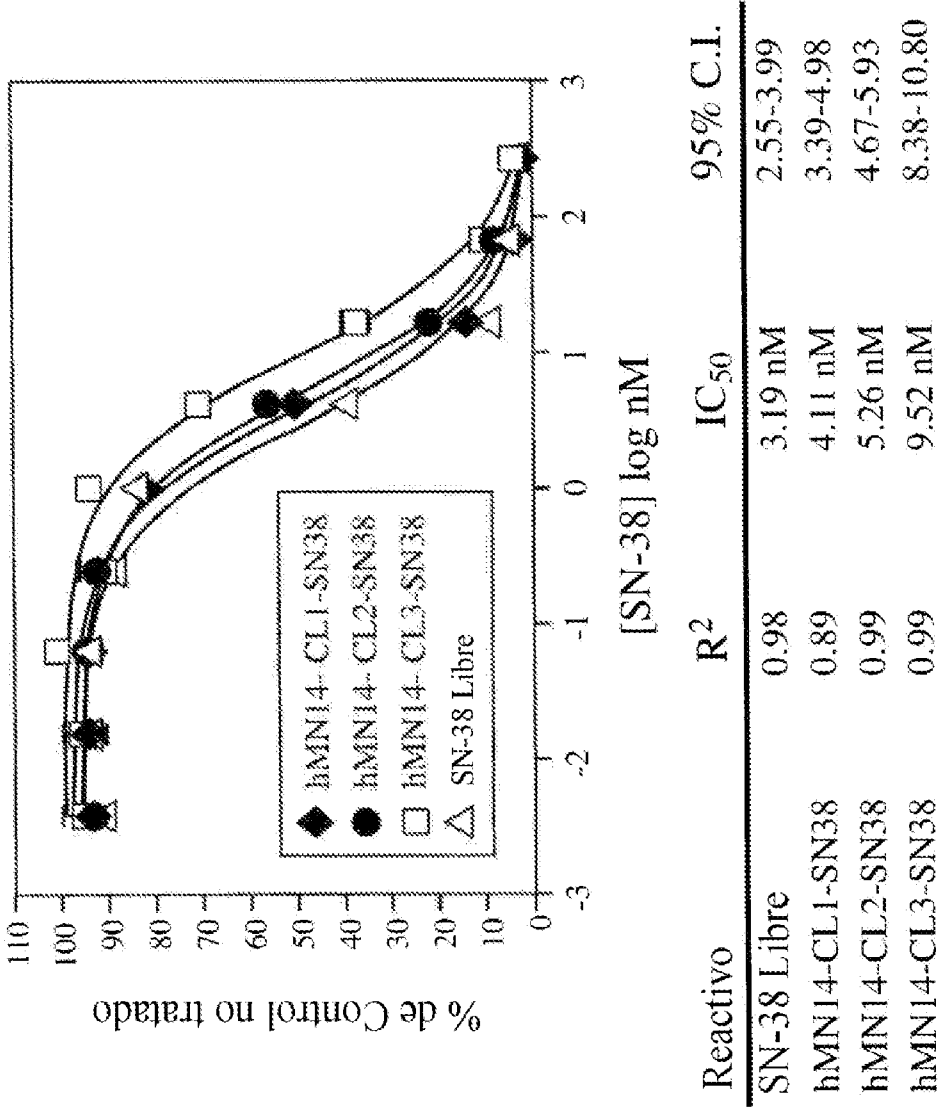


FIG. 4

Datos transformados de citotoxicidad contra el adenocarcinoma de pulmón (Calu-3) (ensayo de 96 horas)

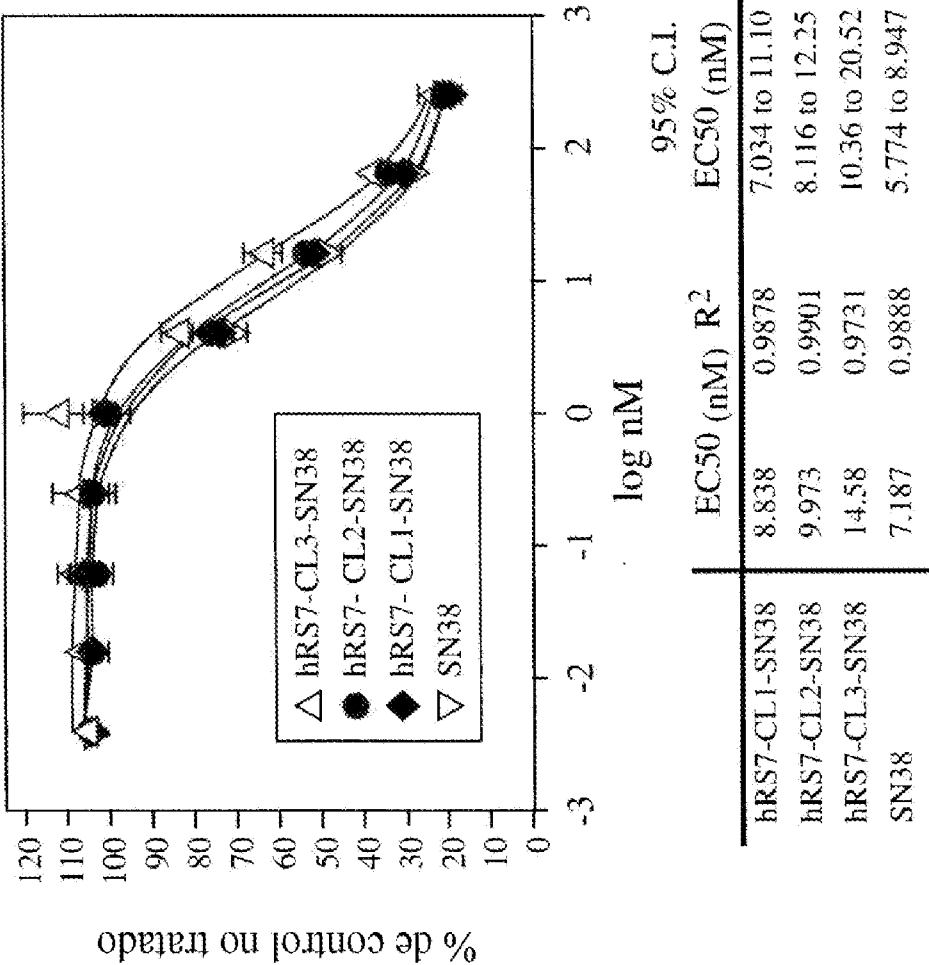


FIG. 5

Curvas de supervivencia de ratones tratados con hMN14-CL-SN38
portadores de enfermedad metastásica pulmonar GW-39
(i.p. q4dx8)

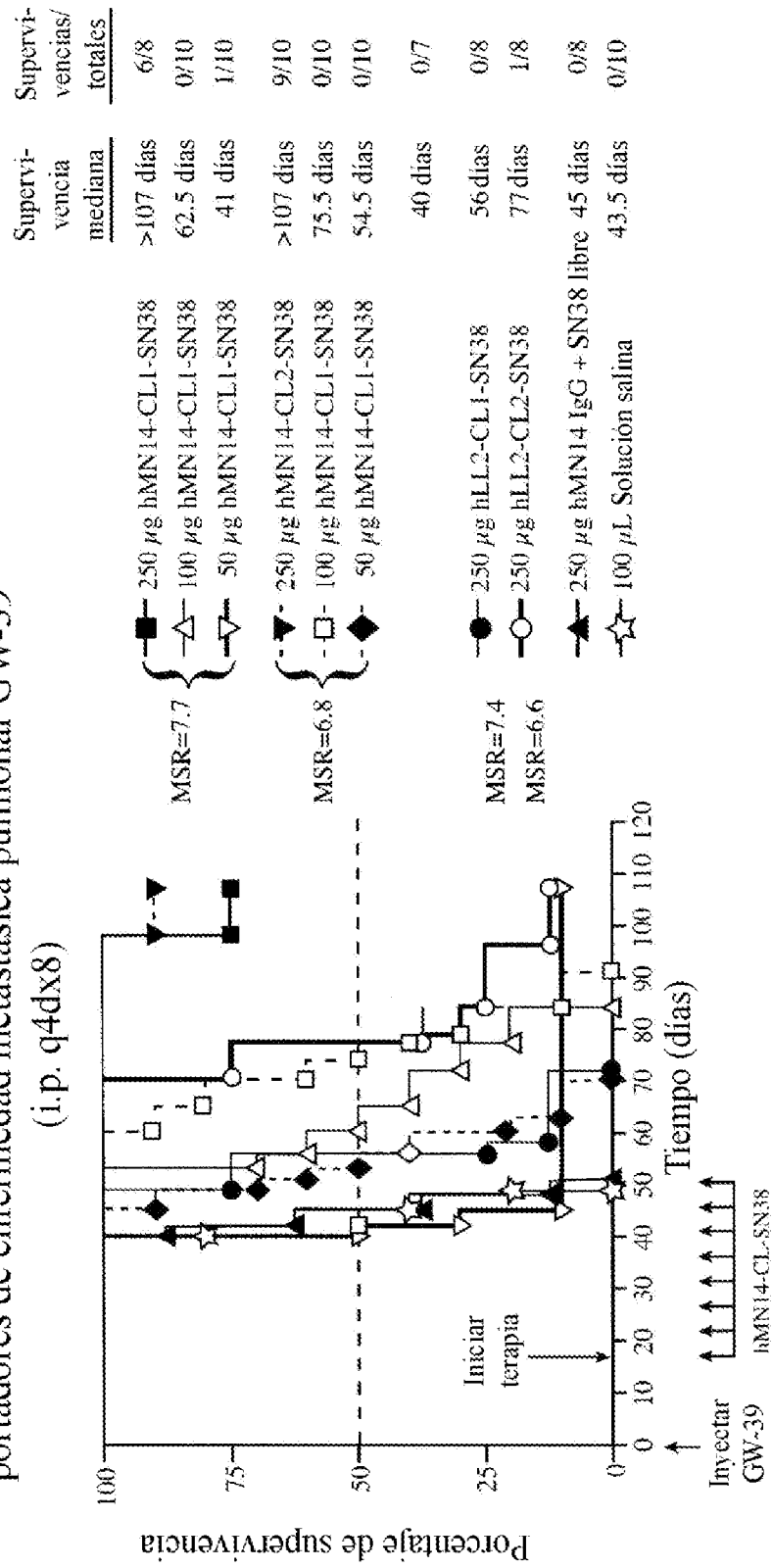


FIG. 6

Eficacia terapéutica de hPAM4-CL2-SN38
en ratones portadores de tumores CaPan1 (n = 4)
(500 µg, q4dx8).

