

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 945 533**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 21178798 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2023 EP 3903829**

54 Título: **Inmunoconjugados con un enlace escindible intracelularmente**

30 Prioridad:

13.02.2009 US 207890 P

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

04.07.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

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 2 945 533 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

Inmunoconjugados con un enlace escindible intracelularmente

5 CAMPO

10 **[0001]** La presente invención se refiere a conjugados terapéuticos con capacidad mejorada para marcar diversas células cancerosas, organismos de enfermedades infecciosas y/o para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, cuyos conjugados contienen una fracción diana (de unión) y una fracción terapéutica perteneciente al grupo de fármacos de la camptotecina. Las fracciones diana y terapéuticas están unidas mediante un enlace intracelular escindible que aumenta la eficacia terapéutica.

FONDO

15 **[0002]** Durante muchos años, el objetivo de los científicos en el campo de la terapia farmacológica específicamente dirigida ha sido utilizar anticuerpos monoclonales (MAbs) para la administración específica de agentes tóxicos a los cánceres humanos. 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 prácticamente ninguna aplicación en otras enfermedades, como las infecciosas y autoinmunes. El agente tóxico suele ser un fármaco quimioterapéutico, aunque también se han conjugado
20 con MAbs radionucleidos emisores de partículas o toxinas bacterianas o vegetales, especialmente para la terapia del cáncer (Sharkey y Goldenberg, CA Cancer J Clin. 2006 Jul-Ago;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).

25 **[0003]** Las ventajas de usar conjugados MAb-fármaco quimioterapéutico son que (a) el fármaco quimioterapéutico en sí está estructuralmente bien definido; (b) el fármaco quimioterapéutico está unido a la proteína MAb usando químicas de conjugación muy bien definidas, a menudo en sitios específicos alejados de las regiones de unión al antígeno de los MAbs; (c) los conjugados MAb-fármaco quimioterapéutico pueden fabricarse 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 MAb con radionucleidos.

35 **[0004]** Los primeros trabajos sobre conjugados proteína-fármaco indicaron que un fármaco se libera preferiblemente en su forma original, una vez que ha sido internalizado en una célula diana, para que el conjugado proteína-fármaco quimioterapéutico sea una terapéutica útil. Trouet et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:626-629 (1982)) demostró la ventaja de utilizar enlaces peptídicos específicos entre el fármaco y la fracción diana, que se escinden lisosómicamente para liberar el fármaco intacto. En particular, se desarrollaron conjugados MAb-fármaco quimioterapéutico preparados utilizando enlazadores suaves que se pueden disolver con ácidos, como los que contienen una hidrazona, basándose en la observación de que el pH en el interior de los tumores era a menudo inferior al pH fisiológico normal (Willner et al. Patent 5,708,146; Trail et al. (Science 261:212-215 (1993)). El primer conjugado MAb-fármaco aprobado, Gemtuzumab Ozogamicina, incorpora un enlace de hidrazona ácido-lábil similar entre un anticuerpo anti-CD33, humanizado P67.6, y un potente derivado de la calicheamicina. 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 fabricaron 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)).

45 **[0005]** Otro enlazador escindible incluye espaciadores de dipéptidos lábiles a la catepsina B, como Phe-Lys o Val-Cit, similares a los espaciadores de péptidos lisosomalmente lábiles de Trouet et al. que contienen de uno a cuatro aminoácidos, que además incorporan un espaciador colapsable entre el fármaco y el dipéptido (Dubowchik, et al., Bioconjugate Chem. 13:855-869 (2002); Firestone et al., US Patent 6,214,345 B1; Doronina et al., NatBiotechnol. 21: 778-784 (2003)). Estos últimos enfoques también se utilizaron en la preparación de un inmunoconjugado de camptotecina (Walker et al., Bioorg Med Chem Lett. 12:217-219 (2002)). Otra fracción escindible que se ha explorado es un enlace éster incorporado en el enlazador entre el anticuerpo y el fármaco quimioterapéutico. Gillimard y Saragovi han descubierto que cuando un éster de paclitaxel se conjugaba con un MAb p75 antirrata, MC192, o con un MAb TrkA antihumano, 5C3, se observaba que el conjugado presentaba una toxicidad específica diana. Gillimard y Saragovi, Cancer Res. 61:694-699 (2001).

55 **[0006]** Los conjugados de la presente invención poseen mayor eficacia, en muchos casos, que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos no conjugados o "desnudos", aunque tales moléculas diana no conjugadas han sido de utilidad en situaciones específicas. En el cáncer, por ejemplo, los anticuerpos desnudos han llegado a desempeñar un papel en el tratamiento de los linfomas (CAMPATH® y RITUXAN®), el cáncer colorrectal y otros tipos de cáncer (ERBITUX® y AVASTIN®), el cáncer de mama (HERECEPTIN®), así como un gran número actualmente en desarrollo clínico (por ejemplo, epratuzumab). En la mayoría de estos casos, el uso clínico ha consistido en combinar estos anticuerpos desnudos, o no conjugados, con otras terapias, como la quimioterapia o la radioterapia.

60 **[0007]** También se utilizan diversos anticuerpos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y otras enfermedades

inmunodisreguladoras, 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 contra las 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. Los anticuerpos desnudos también se estudian 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, resultando sólo 2 patógenos contra los que los anticuerpos están en ensayos clínicos de fase III o se comercializan (virus respiratorio sincitial y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina), con otros 25 en estudios clínicos y 20 interrumpidos durante el estudio clínico.

[0008] Existe la necesidad de desarrollar anticuerpos antipatógenos o anticancerígenos más potentes y otras moléculas de unión. Estas terapias mediadas por anticuerpos pueden desarrollarse para el tratamiento de muchos patógenos diferentes, como bacterias, hongos, virus y parásitos, ya sea desnudos (no conjugados), radiomarcados o conjugados fármaco/toxina. Existe una necesidad adicional de desarrollar conjugados de anticuerpos más eficaces con enlaces escindibles intracelularmente, de uso para el tratamiento del cáncer, patógenos y otras enfermedades. 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 pre-marcación, en los que se utiliza un anticuerpo biespecífico para dirigirse a la lesión, mientras que el agente terapéutico se dirige secundariamente al unirse a uno de los brazos del anticuerpo biespecífico que se ha localizado en el lugar del patógeno, el cáncer o la lesión que se esté tratando (Goldenberg et al., J Clin Oncol. 2006 Feb 10;24(5):823-34.; Goldenberg et al., J Nucl Med. 2008 Jan;49(1):158-63).

[0009] El documento US 2008/166363 se refiere a conjugados terapéuticos que contienen una fracción diana (como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo), un enlazador y una camptotecina como fracción terapéutica. El documento WO 2008/088658 se refiere a métodos y composiciones para la administración de agentes terapéuticos a células, tejidos u organismos diana. Sung-Ju Moon et al., J Med Chem. 2008; 51(21): 6916-26, se refiere a conjugados de anticuerpos de 7-etil-10-hidroxycamptotecina (SN-38) para quimioterapia dirigida contra el cáncer. El documento WO 2007/112193 se refiere a conjugados terapéuticos dirigidos a diversas células enfermas que contienen una fracción diana (como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo), un enlazador y una camptotecina como fracción terapéutica. El documento WO 2004/054622 se refiere a conjugados terapéuticos que contienen una fracción diana y una fracción terapéutica. Las fracciones diana y terapéuticas están unidas mediante un enlace escindible por ácido.

RESUMEN

[0010] La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación resuelve una necesidad no satisfecha en la técnica al proporcionar métodos y composiciones mejorados para la preparación de conjugados de moléculas de unión a fármacos. 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 diana (unión) adecuadas para la marcación selectiva. La fracción diana 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, preferentemente IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4 o IgA, y puede ser un anticuerpo quimérico humano-ratón, un anticuerpo quimérico humano-primate, un anticuerpo humanizado (marco humano y regiones hipervariables (CDR) murinas), o totalmente humano, así como variaciones de los mismos, como los anticuerpos medio-IgG4 (denominados "unicuerpos") descritos por van der Neut Kofschoten et al. (Science 2007; 317:1554-1557). Las enfermedades o afecciones preferidas contra las que existen dichas fracciones diana son, por ejemplo, el cáncer, las afecciones de desregulación inmunitaria, incluidas las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias, y las enfermedades causadas por organismos infecciosos.

[0011] Por lo tanto, los métodos y composiciones divulgados pueden aplicarse para el tratamiento de enfermedades y afecciones para las que se utilizan fracciones diana para administrar agentes citotóxicos. Tales enfermedades o afecciones pueden caracterizarse por la presencia de una molécula o célula diana que no se ve suficientemente afectada cuando se utilizan fracciones diana no conjugadas o desnudas, como en la inmunoterapia del cáncer o de la infección por organismos patógenos. (Para métodos de fabricación de inmunoconjugados de anticuerpos con isótopos, fármacos y toxinas para su uso en terapias de enfermedades, véase, por ejemplo, Patente N.º. 4.699.784; 4.824.659; 5.525.338; 5.677.427; 5.697.902; 5.716.595; 6.071.490; 6.187.284; 6.306.393; 6.548.275; 6.653.104; 6.962.702; 7.033.572; 7.147.856; 7.259.240 y Publ. de Solicitud de Patente de EEUU. N.º. 20050175582 (actualmente abandonada); 20050136001; 20040166115 (actualmente abandonada); 20040043030 (actualmente abandonada); 20030068322 (actualmente abandonada) y 20030026764 (actualmente abandonada))

[0012] La camptotecina (CPT) y sus análogos y derivados son moléculas quimioterapéuticas preferidas. Otras moléculas quimioterapéuticas son los taxanos (por ejemplo, baccatina III, taxol), las epotilonas, los fármacos antraciclínicos (por ejemplo, doxorubicina (DOX), epirubicina, morfolinodoxorubicina (morfolino-DOX), cianomorfolino-doxorubicina (cianomorfolino-DOX) y 2-pirrolinodoxorubicina (2-PDOX); véase Priebe W (ed.), ACS symposium series 574, publicado por American Chemical Society, Washington D.C., 1995 (332pp) y Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2464-2469, 1996), ansamícinas benzoquinoides ejemplificadas por la geldanamícina (DeBoer et al., Journal of Antibiotics 23:442-447, 1970; Neckers et al., Invest. New Drugs 17:361-373, 1999), y similares. La fracción diana se une a al menos una molécula

quimioterapéutica; preferiblemente de 1 a aproximadamente 5 moléculas quimioterapéuticas; más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 12 moléculas quimioterapéuticas.

5 **[0013]** Con respecto al grupo de fármacos CPT, son relevantes las cuestiones de insolubilidad en tampones acuosos y la labilidad de la fracción δ -lactona del anillo E de sus estructuras en condiciones fisiológicas. Un enfoque ha consistido en acilar el grupo 20-hidroxilo 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 descrito como método para fabricar un derivado hidrosoluble de CPT (Vishnuvajjala et al., Patente de EEUU. Nº 4.943.579) y en la preparación de una CPT derivada con PEG (Greenwald, et al. *J. Med. Chem.* 39: 1938-1940 (1996)). En este 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 semivida *in vivo* de la CPT, y el fármaco se libera gradualmente de su conjugado mientras está en circulación *in vivo*. Un ejemplo de derivado hidrosoluble de la CPT es la CPT-11. Existen numerosos datos clínicos sobre la farmacología de CPT-11 y su conversión *in vivo* en el SN-38 activo (Iyer y Ratain, *Cancer Chemother Pharmacol.* 42:S31-43 (1998); Mathijssen et al., *Clin Cancer Res.* 7:2182-2194 (2002); Rivory, *Ann NY Acad Sci.* 922:205-215, 2000)). La forma activa SN-38 es de 2 a 3 órdenes de magnitud más potente que la CPT-11.

20 **[0014]** En ciertas formas de realización ejemplares, los conjugados farmacológicos de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden utilizarse para marcar el fármaco terapéutico a patógenos, como bacterias, virus, hongos y parásitos. En formas de realización preferidas, dichas fracciones diana conjugadas con fármacos pueden utilizarse en combinación con otras modalidades terapéuticas, como antifúngicos, antibióticos y fármacos antivirales y/o anticuerpos desnudos, inmunomoduladores (por ejemplo, interferones, interleucinas y/o citoquinas). El uso de radioinmunoterapia para el tratamiento de organismos infecciosos se describe, por ejemplo, en Patente de EEUU. Nº. 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 Publicación de la Solicitud de Patente de EEUU. Nº. 20020136690 y 20030103982.

30 **[0015]** En ciertas formas de realización que implican el tratamiento del cáncer, los conjugados de fármacos pueden usarse en combinación con cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia con anticuerpos desnudos, radioinmunoterapia, inmunomoduladores, vacunas y similares. Se prefieren combinaciones similares para el tratamiento de otras enfermedades susceptibles de ser tratadas con fracciones diana, como las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, los conjugados de camptotecina pueden combinarse con inhibidores del TNF, anticuerpos contra células B, interferones, interleucinas y otros agentes eficaces para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Sjögren, la esclerosis múltiple, la vasculitis, así como la diabetes de tipo I (diabetes juvenil). Estas terapias combinadas pueden permitir la administración de dosis más bajas de cada uno de los fármacos, reduciendo así algunos efectos secundarios graves y, potencialmente, los ciclos terapéuticos necesarios. En las enfermedades víricas, los inmunconjugados farmacológicos pueden combinarse con otros fármacos terapéuticos, inmunomoduladores, MAbs desnudos o vacunas (por ejemplo, MAbs contra los virus de la hepatitis, el VIH o el papiloma, o vacunas basadas en inmunógenos de estos virus). Los anticuerpos y las vacunas basadas en antígenos contra estos y otros patógenos víricos son conocidos en la técnica y, en algunos casos, ya se utilizan comercialmente.

45 **[0016]** En ocasiones, en un proceso de preparación de conjugados, un fármaco se derivatiza primero con un primer enlazador, cuyo primer enlazador contiene una fracción reactiva capaz de combinarse con un segundo enlazador que contiene además un grupo de acoplamiento de fracción diana; en el que el primer enlazador posee también una fracción definida de polietilenglicol (PEG) para la solubilidad en agua, y opcionalmente una fracción que puede ser escindida intracelularmente por peptidasas intracelulares o por el entorno de bajo pH de las vesículas endosomales y lisosomales, y opcionalmente un espaciador de aminoácidos entre el fármaco y el primer enlazador; en el que el segundo enlazador contiene un grupo reactivo capaz de reaccionar con el conjugado fármaco-(primer enlazador) mediante la reacción de cicloadición acetileno-azida catalizada por iones de cobre (+1), denominada "química de clic". Preferiblemente, la fracción definida de PEG de bajo peso molecular con un número definido de subunidades monoméricas, como se expone más adelante.

55 **[0017]** En ocasiones, en un proceso de preparación de conjugados como el discutido en el párrafo anterior, el segundo enlazador tiene un único grupo de acoplamiento de fracción diana, pero múltiples grupos reactivos capaces de reaccionar con el conjugado fármaco-(primer enlazador), amplificando así el número de moléculas de fármaco conjugadas a la fracción diana.

60 **[0018]** En ocasiones, en un proceso de preparación de conjugados, el enlazador se conjuga primero con un fármaco, produciendo así un conjugado fármaco-enlazador; en el que dicha preparación de conjugado fármaco-enlazador implica la protección selectiva y desprotección de un grupo más reactivo en un fármaco que contiene múltiples grupos funcionales; en el que dicho conjugado fármaco-enlazador opcionalmente no se purifica; y en el que dicho conjugado fármaco-enlazador se conjuga posteriormente con un anticuerpo monoclonal o fragmento.

65 **[0019]** También se proporciona un método para tratar el cáncer (malignidad), una enfermedad autoinmune, una infección o una lesión infecciosa con los conjugados aquí descritos. Los conjugados de fracciones diana de fármacos pueden fabricarse mediante los procedimientos reivindicados. En ocasiones, se utilizan kits para realizar los procesos

reivindicados.

[0020] La invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende:

- 5 (a) una fracción diana;
 (b) una fracción quimioterapéutica; y
 (c) un enlazador unido covalentemente a la fracción diana por medio de un grupo de unión a la fracción diana y a la fracción quimioterapéutica por medio de una fracción disociable intracelularmente.

10 En ocasiones, un inmunoconjugado comprende:

- (a) fracción diana;
 (b) una fracción quimioterapéutica; y
 15 (c) un enlazador unido covalentemente a la fracción diana mediante un grupo de unión a la fracción diana y a la molécula quimioterapéutica mediante una molécula disociable intracelularmente; en el que dicho enlazador unido a la molécula terapéutica comprende además un L-aminoácido o un polipéptido formado por hasta cuatro L-aminoácidos.

[0021] En ocasiones, la fracción que puede disolverse intracelularmente es un carbonato que comprende un grupo hidroxilo activado de la fracción quimioterapéutica y una fracción de etanolamina sustituida o un alcohol 4-aminobencílico, y este último está unido, a través de su grupo amino, a un reticulante que termina en el grupo de unión de la fracción diana; y en el que la fracción de etanolamina sustituida se deriva de un aminoácido L natural, con el grupo de ácido carboxílico de este último sustituido por una fracción de hidroximetilo; y en el que el alcohol 4-aminobencílico está opcionalmente sustituido por un grupo alquilo C₁-C₁₀ en la posición bencílica.

[0022] En ocasiones, la fracción disociable intracelularmente es un carbonato que comprende un grupo hidroxilo activado de la fracción quimioterapéutica y una fracción de etanolamina sustituida, y esta última, a través de su grupo amino, está unida a un L-aminoácido o a un polipéptido que comprende hasta cuatro fracciones de L-aminoácido; en el que el extremo N-terminal está unido a un reticulador que termina en el grupo de unión a la fracción diana; y en el que la fracción de etanolamina sustituida se deriva opcionalmente de un aminoácido L, con el grupo de ácido carboxílico de este último sustituido por una fracción de hidroximetilo.

[0023] En ocasiones, la fracción susceptible de eliminación intracelular es un carbonato que comprende un grupo hidroxilo activado de la fracción quimioterapéutica y un alcohol 4-aminobencílico o un alcohol 4-aminobencílico sustituido con un grupo alquilo C₁-C₁₀ en la posición bencílica, y este último, a través de su grupo amino, está unido a un L-aminoácido o a un polipéptido que comprende hasta cuatro fracciones de L-aminoácido; en el que el extremo N-terminal está unido a un enlazador cruzado que termina en el grupo de unión de la fracción diana.

[0024] En ocasiones, un grupo amino de una fracción quimioterapéutica se acopla al grupo hidroxilo activado de una fracción de etanolamina sustituida y protegida con amina o un alcohol 4-aminobencílico, y este último se une, a través de su grupo amino, a un L-aminoácido o a un polipéptido que comprende hasta cuatro fracciones de L-aminoácido; en el que el N-terminal está unido a un reticulador que termina en el grupo de unión a la fracción diana; en el que dicha fracción de etanolamina sustituida se deriva opcionalmente de un aminoácido L, con el grupo de ácido carboxílico de este último sustituido por una fracción de hidroximetilo; y en el que el alcohol 4-aminobencílico está opcionalmente sustituido con un grupo alquilo C₁-C₁₀ en la posición bencílica. A continuación, el derivado farmacológico bifuncional se conjuga con una fracción diana para obtener un inmunoconjugado, como se ha explicado anteriormente. Al marcar el sitio de la enfermedad con el inmunoconjugado, el inmunoconjugado es endocitosado y catabolizado para liberar la fracción fármaco-enlazador; en el que el grupo amino libre de la fracción de etanolamina sustituida ayuda a la liberación del fármaco libre por ataque nucleofílico al grupo carbonilo de la fracción de carbamato.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0025]

55 **FIG. 1.** Terapia preclínica *in vivo* de ratones atímicos desnudos, portadores de carcinoma pancreático humano Capan 1, con conjugados MAb-CL2A-SN-38.

FIG. 2. Terapia preclínica *in vivo* de ratones atímicos desnudos, portadores de carcinoma pancreático humano BxPC3, con conjugados MAb-CL2A-SN-38.

60 **FIG. 3.** Terapia preclínica *in vivo* de ratones desnudos atímicos, portadores de carcinoma de colon humano LS174T, con el conjugado hMN-14-CL2A-SN-38.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

65 **[0026]** En la descripción que sigue, se utilizan una serie de términos y se proporcionan las siguientes definiciones para

facilitar la comprensión de la materia reivindicada. Los términos que no se definen expresamente en el presente documento se utilizan de acuerdo con su significado simple y corriente.

[0027] A menos que se especifique lo contrario, un/una significa "uno o más".

[0028] El término aproximadamente se utiliza aquí para significar más o menos el diez por ciento (10%) de un valor. Por ejemplo, "aproximadamente 100" se refiere a cualquier número entre 90 y 110.

[0029] El término fracción diana, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula, complejo o agregado que se une específica o selectivamente a una molécula, célula, partícula, tejido o agregado diana. El experto entenderá que la unión específica se refiere a la unión a una diana particular sin reactividad cruzada con otras dianas, mientras que la unión selectiva se refiere a la unión preferente a una diana particular. En la invención, una fracción diana es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico u otra molécula o compuesto basado en anticuerpos. Sin embargo, se conocen en la técnica otros ejemplos de fracciones diana, como aptámeros, avímeros, ligandos de unión a receptores, ácidos nucleicos, pares de unión biotina-avidina, péptidos o proteínas de unión, etc. Los términos "fracción diana" y "fracción de unión" se utilizan aquí como sinónimos.

[0030] Un anticuerpo, tal como se utiliza en el presente documento, 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 de unión a antígeno 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 ámbito de la materia reivindicada. Dichos anticuerpos incluyen, entre otros, IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4 (y subformas de IgG4), así como isotipos de IgA.

[0031] Un fragmento de anticuerpo es una porción de un anticuerpo, como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv (Fv de cadena simple), anticuerpos de dominio simple (DAB o VHH) y similares, incluidas las semimoléculas de IgG4 citadas anteriormente (van der Neut Kofschoten et al. (Science 2007; 317(14 Sept):1554-1557). Independientemente de su 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 proteínas sintéticas o modificadas genéticamente que actúan como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados consistentes en las regiones variables, como los fragmentos "Fv" consistentes en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas recombinantes de cadena única en las que las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un enlazador peptídico ("proteínas scFv"), y unidades mínimas de reconocimiento 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 multiespecíficas. En el caso de las multivalentes, tienen más de un sitio de unión contra el epítipo específico, mientras que con las formas multiespecíficas, se une más de un epítipo (ya sea del mismo antígeno o contra un antígeno y otro diferente). Tal como se utiliza en el presente documento, el término componente de anticuerpo incluye un anticuerpo completo, una proteína de fusión y sus fragmentos.

[0032] Un anticuerpo desnudo es generalmente un anticuerpo entero 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 lugar a la lisis celular. Sin embargo, la porción Fc puede no ser necesaria para la función terapéutica del anticuerpo, sino que otros mecanismos, como la apoptosis, la antiangiogénesis, la actividad antimetastásica, la actividad antiadhesión, como la inhibición de la adhesión heterotípica u homotípica, y la interferencia en las vías de señalización, pueden entrar en juego e interferir en la progresión de la enfermedad. Los anticuerpos desnudos incluyen anticuerpos policlonales y 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". Tal y como se define aquí, "desnudo" es sinónimo de "no conjugado" y significa no unido o conjugado a un agente terapéutico.

[0033] Las enfermedades autoinmunes son trastornos causados por una respuesta inmunitaria del organismo contra sus propios tejidos. Algunos ejemplos son 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, 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 obliterante, síndrome de Sjogren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, síndrome de Sjogren, Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, artritis reumatoide, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, 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 Solicitud Provisional N^o. de Serie 60/360.259, depositada el 1 de marzo de 2002.

[0034] Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante que contiene los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, incluidas las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de una especie, preferentemente un anticuerpo de roedor, más preferentemente 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 del de otras especies, como un primate, un gato o un perro.

[0035] Un anticuerpo humanizado es una proteína recombinante en la que las CDR de un anticuerpo de una especie; por ejemplo, un anticuerpo murino, se transfieren de las cadenas variables pesadas y ligeras del anticuerpo murino a dominios variables pesados y ligeros humanos (regiones variables). Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. En algunos casos, pueden modificarse residuos específicos de la región variable del anticuerpo humanizado, en particular los que están en contacto o cerca de las secuencias CDR, por ejemplo sustituyéndolos por los residuos correspondientes del anticuerpo original murino, de roedor, de primate subhumano o de otro tipo.

[0036] Un anticuerpo humano es un anticuerpo obtenido, por ejemplo, de ratones transgénicos que han sido "diseñados" para producir anticuerpos humanos en respuesta a un desafío antigénico. En esta técnica, se introducen elementos de los loci de las cadenas pesadas y ligeras humanas en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones dirigidas de los loci endógenos de las cadenas pesadas y ligeras. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para diversos antígenos, y los ratones pueden utilizarse para producir hibridomas humanos secretores de anticuerpos. 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 totalmente humano también puede construirse por métodos de transfección genética o cromosómica, así como por tecnología de expresión en fago, 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 los anticuerpos se clonan dentro del marco de un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. De este modo, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fago puede realizarse en una gran variedad de formatos; para su revisión, véase, por ejemplo, Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:556-571 (1993). Los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas *in vitro*. Véase Patente de EEUU. N.º. 5,567,610 y 5,229,275.

[0037] Las Enfermedades Infecciosas, tal y como se utilizan aquí, son enfermedades que implican infección por patógenos como bacterias, rickettsias, micoplasmas, protozoos, hongos, virus, parásitos u otros agentes microbianos. Algunos ejemplos son 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*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemophilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, virus del Nilo Occidental, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, virus de la rabia, virus de la 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, virus reo, virus de la poliomielitis, 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 rhodesiensei*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Babesia bovis*, *Elmeria tenella*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania tropica*, *Trichinella spiralis*, *Theileria parva*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti*, *Mycoplasma arthritis*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. salivarium* y *M. pneumoniae*. En Casadevall, *Clin Immunol* 1999; 93(1):5-15, se incluye una revisión en la que se enumeran los anticuerpos contra organismos infecciosos (anticuerpos antitoxina y antivirales), así como otros objetivos.

[0038] Un agente terapéutico es una molécula o átomo que se administra por separado, simultáneamente 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. 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 tintes fotoactivos, radioisótopos o radionucleidos, oligonucleótidos, ARN de interferencia, péptidos, agentes antiangiogénicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, quimiocinas, profármacos, enzimas, proteínas o péptidos de unión o combinaciones de los mismos.

[0039] Un conjugado es un componente anticuerpo u otra fracción diana conjugado con un agente terapéutico, como los descritos anteriormente. En el presente documento, los términos "conjugado" e "inmunoconjugado" se utilizan

indistintamente.

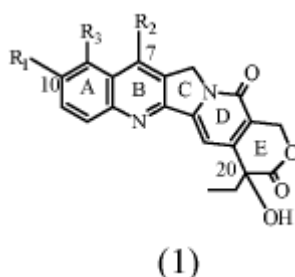
[0040] Tal como se utiliza en el presente documento, el término proteína de fusión de anticuerpos es una molécula de unión a antígeno producida recombinantemente en la que uno o más anticuerpos naturales, anticuerpos de cadena simple o fragmentos de anticuerpos están unidos (fusionados) a otra fracción, como una proteína o toxina peptídica, citocina, hormona, etc. La proteína de fusión puede comprender dos o más anticuerpos iguales o diferentes, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos de cadena simple fusionados, que pueden unirse al mismo epítipo, a diferentes epítopos del mismo antígeno o a diferentes antígenos. Una proteína de fusión de anticuerpos comprende al menos un sitio de unión a antígeno. La valencia de la proteína de fusión indica el número total de brazos o sitios de unión que tiene la proteína de fusión al antígeno o antígenos o al 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 así la avidéz de unión al antígeno, o a diferentes antígenos. La especificidad indica cuántos tipos diferentes de antígeno o epítipo es capaz de unir una proteína de fusión de anticuerpos; es decir, monoespecífico, biespecífico, triespecífico, multiespecífico. Según 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 tipo de antígeno o epítipo. Una proteína de fusión monoespecífica y multivalente tiene más de un sitio de unión para el mismo antígeno o epítipo. Por ejemplo, un diacuerpo monoespecífico es una proteína de fusión con dos sitios de unión reactivos con el mismo antígeno. La proteína de fusión puede comprender una combinación multivalente o multiespecífica de diferentes componentes de anticuerpos o múltiples copias del mismo componente de anticuerpos. La proteína de fusión puede contener además un agente terapéutico.

[0041] 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 autoinmunes. Un ejemplo de inmunomodulador descrito en el presente documento es una citoquina, que es una pequeña proteína 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 las células. Como comprenderá el experto, entre los ejemplos de citocinas se 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 citocinas. Ciertas interleucinas e interferones son ejemplos de citocinas que estimulan la proliferación de células T u otras células inmunitarias.

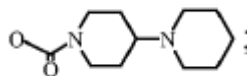
[0042] CPT es la abreviatura de camptotecina, y como se usa en la presente solicitud CPT representa la camptotecina misma o un análogo o derivado de la camptotecina. Las estructuras de la camptotecina y de algunos de sus análogos, con la numeración indicada y los anillos etiquetados con las letras A-E, se dan en la fórmula 1 del Gráfico 1 a continuación.

Gráfico 1

[0043]



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



$R_2 =$ etilo; $R_3 = H$
 SN-38: $R_1 = OH; R_2 =$ etilo; $R_3 = H$
 Topotecano: $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = CH_2-N(CH_3)_2$

Conjugados de camptotecina

[0044] A continuación se describen métodos para la preparación de conjugados de fármacos quimioterapéuticos con fracciones diana (TM), como un anticuerpo (MAb). (1) La solubilidad del fármaco se mejora colocando una fracción definida de polietilenglicol (PEG) (es decir, un PEG que contenga un número definido de unidades monoméricas) entre el fármaco y el vector diana, siendo el PEG definido un PEG de bajo peso molecular, que contenga preferentemente de 1 a 30 unidades monoméricas, y más preferentemente de 1 a 12 unidades monoméricas; (2) un primer enlazador conecta el fármaco en un extremo y termina con un grupo acetileno o azida en el otro extremo; este primer enlazador 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 al grupo amina de un aminoalcohol, y el grupo hidroxilo de este último se une al grupo hidroxilo del fármaco en forma de carbonato; alternativamente, la fracción no azida (o acetilénica) de dicho PEG bifuncional definido se une opcionalmente al N-terminal de un L-aminoácido o un polipéptido, con el C-terminal unido al grupo amino de un aminoalcohol, y el grupo hidroxilo de este último se une al grupo hidroxilo del fármaco en forma de carbonato o carbamato, respectivamente; (3) un segundo enlazador, que comprende un grupo de acoplamiento de la fracción diana y un grupo reactivo complementario al grupo azida (o acetileno) del primer enlazador, a saber, acetileno (o azida), reacciona con el conjugado fármaco-(primer enlazador) mediante una reacción de cicloadición acetileno-azida para proporcionar el producto farmacológico bifuncional final que es útil para conjugarse con las fracciones diana de la enfermedad, como los anticuerpos de marcación de la enfermedad; (4) el grupo de acoplamiento de anticuerpos está diseñado para ser un tiol o un grupo tiol-reactivo; (5) se han ideado métodos para la regeneración selectiva del grupo 10-hidroxilo en presencia del carbonato de C-20 en preparaciones de precursor fármaco-enlazador que implican análogos de CPT tales como SN-38; (6) también se utilizan otros grupos protectores para grupos hidroxilo reactivos en fármacos como el hidroxilo fenólico en SN-38, por ejemplo, como t-butildimetilsililo o t-butildifenilsililo, que se desprotegen mediante fluoruro de tetrabutilamonio antes de la unión del fármaco derivatizado a una fracción de acoplamiento de vector diana y (6) el grupo 10-hidroxilo de los análogos de CPT se protege alternativamente como un éster o carbonato, distinto del "BOC", de manera que la CPT bifuncional se conjuga con una fracción diana sin desprotección previa de este grupo protector, y el grupo protector se desprotege fácilmente en condiciones de pH fisiológico tras la administración del bioconjugado. En el acoplamiento acetileno-azida, denominado "química de clic", la parte de azida puede estar en L2 y la parte de acetileno en L3. Alternativamente, L2 puede contener acetileno y L3 azida. La "química de 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.B.C.): 1128-37). La química del 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 de clic es que es quimioselectiva y complementa otras químicas de conjugación bien conocidas, como la reacción tiol-maleimida. En la siguiente discusión, 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.

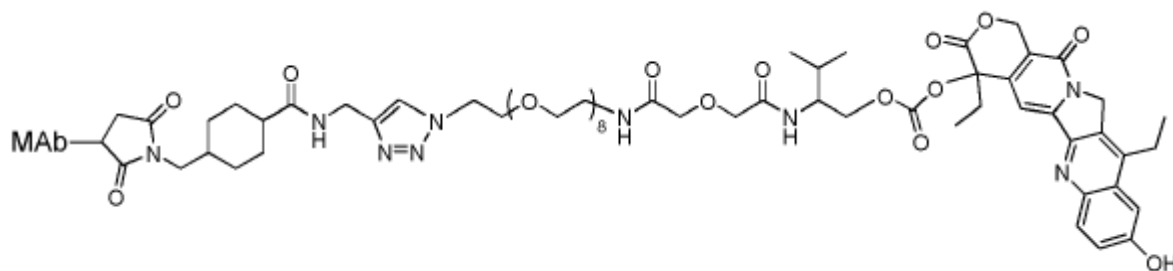
[0045] Un conjugado de un derivado farmacológico y un anticuerpo puede ser de la fórmula general 2,



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

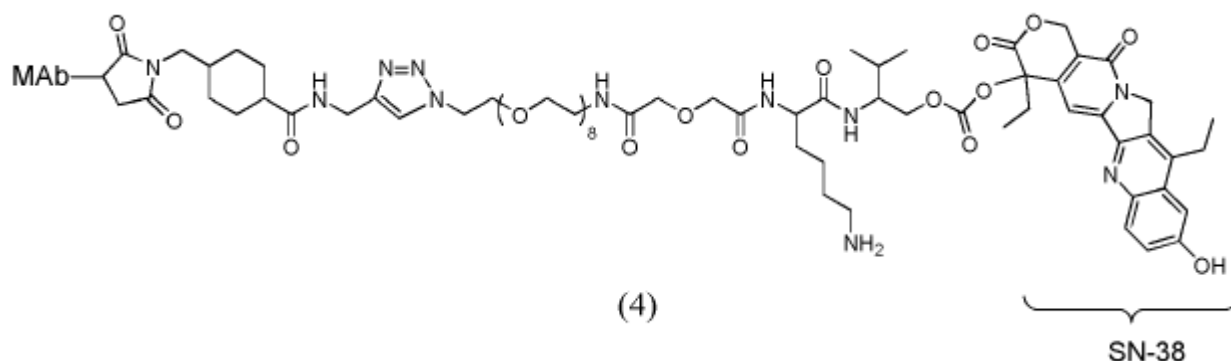
[0046] En una forma de realización de la fórmula 2, A' es una etanolamina sustituida derivada de un L-aminoácido, en la que el grupo ácido carboxílico del aminoácido se sustituye por una fracción hidroximetil. A' puede derivarse de cualquiera de los siguientes L-aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

[0047] En un ejemplo del conjugado de la forma de realización de fórmula 2, m es 0, A' es L-valinol, y el fármaco se ejemplifica por SN-38. La estructura resultante se muestra en la fórmula 3.



(3)

[0048] En otro ejemplo del conjugado de la forma de realización de fórmula 2, m es 1 y está representado por una L-lisina derivatizada, A' es L-valinol, y el fármaco está ejemplificado por SN-38. La estructura se muestra en la fórmula 4.

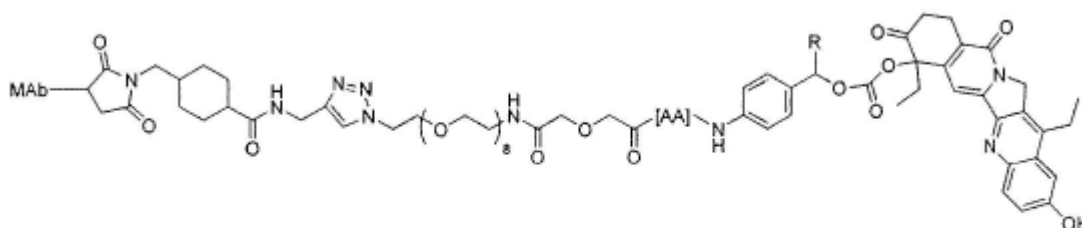


[0049] En esta realización, primero se forma un enlace amida entre el ácido carboxílico de un aminoácido como la lisina y el grupo amino del valinol, utilizando grupos protectores ortogonales para los grupos amino de la lisina. El grupo protector del N-terminal de la lisina se elimina, manteniendo intacto el grupo protector de la cadena lateral de la lisina, y el N-terminal se acopla al grupo carboxilo del PEG definido con azida (o acetileno) en el otro extremo. A continuación, el grupo hidroxilo del valinol se une al derivado 20-cloroformato del SN-38 10-hidroxi protegido, y este intermediario se acopla a un componente L2 que lleva la fracción de unión al vector diana, así como el grupo acetileno (o azida) complementario implicado en la química de cicloadición click. Finalmente, la eliminación de los grupos protectores tanto en la cadena lateral de la lisina como en la SN-38 da el producto de este ejemplo, mostrado en la fórmula 3.

[0050] Aunque no se desea estar limitado por la teoría, el producto SN-38 de pequeño MW, a saber, el carbonato de valinol-SN-38, generado tras la proteólisis intracelular, tiene la vía adicional de liberación de SN-38 intacto mediante ciclización intramolecular en la que intervienen el grupo amino del valinol y el carbonilo del carbonato.

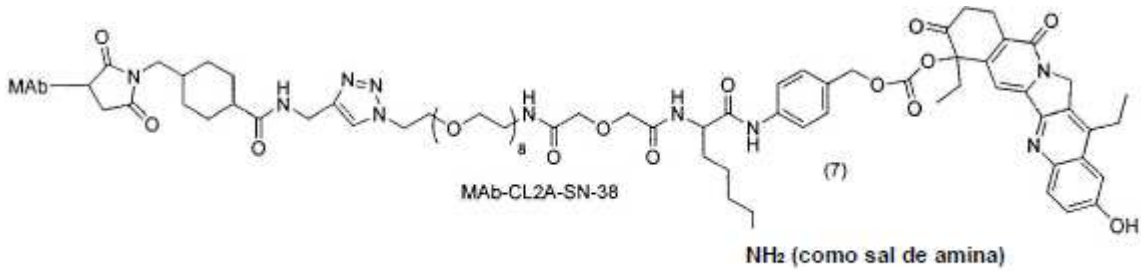
[0051] En otra forma de realización, A' de la fórmula general 2 es A-OH, donde A-OH es una fracción colapsable como el alcohol 4-aminobencílico o un alcohol 4-aminobencílico sustituido con un grupo alquilo C₁-C₁₀ en la posición bencílica, y este último, a través de su grupo amino, está unido a un L-aminoácido o a un polipéptido que comprende hasta cuatro fracciones de L-aminoácido; en el que el N-terminal está unido a un reticulador que termina en el grupo de unión a la fracción diana.

[0052] A continuación se da un ejemplo, en el que la forma de realización A-OH de A' de la fórmula general (2) se deriva del alcohol 4-aminobencílico sustituido, y 'AA' se compone de un único L-aminoácido con m = 1 en la fórmula general (2), y el fármaco se ejemplifica con SN-38. La estructura se representa a continuación (fórmula 5, denominada MAb-CLX-SN-38). El aminoácido único de AA se selecciona entre cualquiera de los siguientes L-aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. El sustituyente R en la fracción de alcohol 4-aminobencílico (forma de realización A-OH de A') es hidrógeno o un grupo alquilo seleccionado entre grupos alquilo C₁-C₁₀.

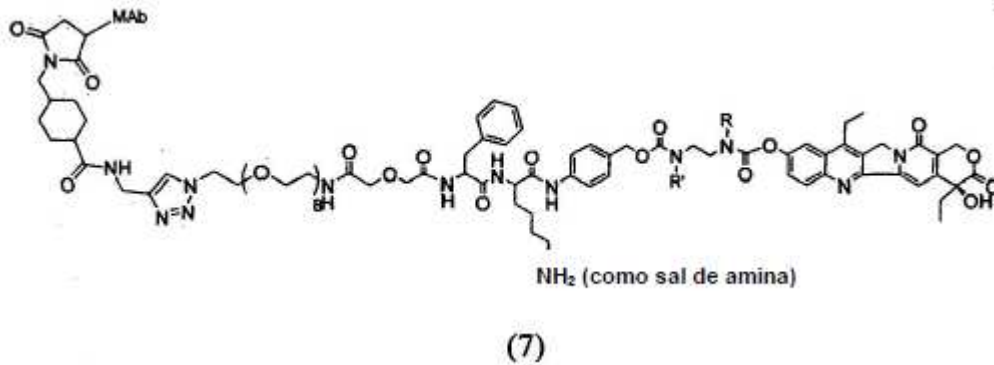


MAb-CLX-SN-38 (5)

[0053] El conjugado para uso de la invención comprende MAb-CLX-SN-38 de fórmula 5, en la que el aminoácido único AA es L-lisina y R = H, y el fármaco es SN-38 (fórmula 6; denominado MAb-CL2A-SN-38).

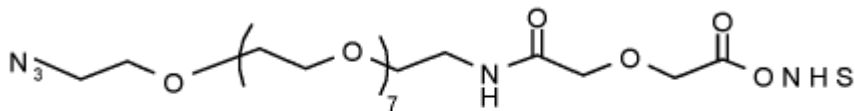


[0054] Otras formas de realización son posibles en el contexto de las camptotecinas que contienen 10-hidroxi, como la SN-38. En el ejemplo del SN-38 como fármaco, el grupo 10-hidroxi más reactivo del fármaco se derivatiza dejando inalterado el grupo 20-hidroxi. Dentro de la fórmula general 2, A' es una etilendiamina sustituida. Un ejemplo de esta realización está representado por la fórmula "7" siguiente, en la que el grupo hidroxilo fenólico de SN-38 se derivatiza como carbamato con una etilendiamina sustituida, con la otra amina de la diamina derivatizada como carbamato con un alcohol 4-aminobencílico, y el grupo amino de este último se une al dipéptido Phe-Lys. En esta estructura (fórmula 7), R y R' son independientemente hidrógeno o metilo. Se denomina MAb-CL17-SN-38 o MAb-CL2E-SN-38, cuando R = R' = metilo.



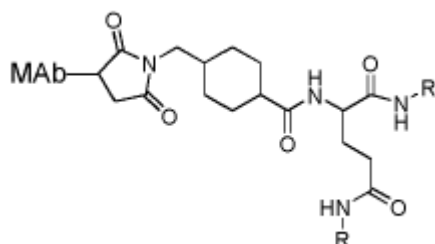
[0055] En una forma de realización, el AA comprende una fracción polipeptídica, preferiblemente un di, tri o tetrapéptido, que es escindible por una peptidasa intracelular. Algunos ejemplos son: Ala-Leu, Leu-Ala-Leu y Ala-Leu-Ala-Leu (Trouet et al., 1982).

[0056] En ocasiones, el componente L1 del conjugado contiene un espaciador definido de polietilenglicol (PEG) con 1-30 unidades monoméricas repetidas. En ocasiones, el PEG es un PEG definido con 1-12 unidades monoméricas repetidas. La introducción de PEG puede implicar el uso de derivados heterobifuncionalizados de PEG que están disponibles comercialmente. El PEG heterobifuncional puede contener un grupo azida o acetileno. Un ejemplo de PEG definido heterobifuncional que contiene 8 unidades monoméricas repetidas, siendo "NHS" succinimido, se da a continuación en la fórmula 8:

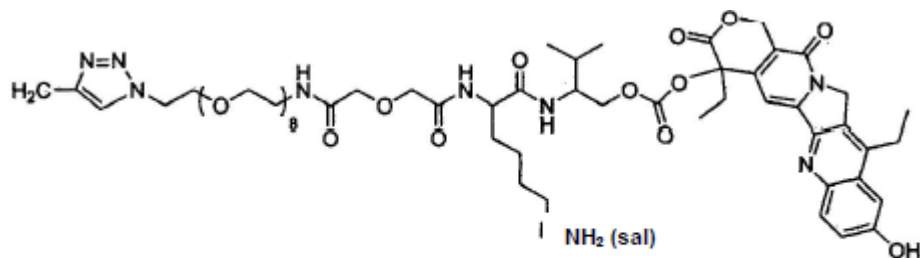


[0057] En ocasiones, L2 tiene una pluralidad de grupos acetileno (o azida), que oscilan entre 2-40, pero preferiblemente 2-20, y más preferiblemente 2-5, y una única fracción de unión al vector diana.

[0058] A continuación se muestra un conjugado SN-38 representativo de un anticuerpo que contiene múltiples moléculas de fármaco y una única molécula de unión al vector diana. El componente "L2" de esta estructura está unido a 2 grupos acetilénicos, lo que da lugar a la unión de dos moléculas SN-38 unidas por azidas. La unión a MAb se representa como una succinimida.



Donde residuo R es:



(9)

[0059] En ocasiones, cuando el fármaco bifuncional contiene una fracción tiol-reactiva como grupo de unión al anticuerpo, los tioles del anticuerpo se generan en los grupos lisina del anticuerpo utilizando un reactivo tiolante. 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 leve de los enlaces disulfuro entre cadenas en el anticuerpo (Willner et al., *Bioconjugate Chem.* 4:521-527 (1993)) utilizando agentes reductores como el ditioneitol (DTT) se pueden generar de 7 a 10 tioles en el anticuerpo, lo que tiene la ventaja de incorporar múltiples restos de fármaco en la región intercadena del MAb, lejos de la región de unión al antígeno.

[0060] En ocasiones, la fracción quimioterapéutica se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina (DOX), epirubicina, morfolinodoxorrubicina (morfolino-DOX), cianomorfolino-doxorrubicina (cianomorfolino-DOX), 2-pirrolinodoxorrubicina (2-PDOX), CPT, 10-hidroxi-camptotecina, SN-38, topotecán, lurtotecán, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocampotecina, taxanos, geldanamicina, ansamicinas y epotilonas. En el conjugado para uso de la invención, la fracción quimioterapéutica es SN-38. Preferiblemente, la fracción diana se une a al menos una fracción quimioterapéutica; preferiblemente de 1 a aproximadamente 12 fracciones quimioterapéuticas; más preferiblemente de 6 a aproximadamente 12 fracciones quimioterapéuticas.

[0061] El componente enlazador 'L2' puede comprender un grupo tiol que reacciona con un residuo tiol-reactivo introducido en uno o más grupos amino de cadena lateral de lisina de dicha fracción diana. En tales casos, el anticuerpo se pre-derivatiza con un grupo tiol-reactivo como una maleimida, vinilsulfona, bromoacetamida o yodoacetamida por procedimientos bien descritos en la técnica.

[0062] En el contexto de estas formas de realización, se descubrió sorprendentemente un proceso mediante el cual se pueden preparar fármaco-enlazadores CPT en los que la CPT tiene además un grupo 10-hidroxilo. Este proceso implica, entre otras cosas, la protección del grupo 10-hidroxilo como un derivado *t-butiloxycarbonilo* (BOC), seguido de la preparación del penúltimo intermedio del conjugado fármaco-enlazador. Normalmente, la eliminación del grupo BOC requiere un tratamiento con un ácido fuerte, como el ácido trifluoroacético (TFA). En estas condiciones, el carbonato del 20-O-enlazador de la CPT, que contiene grupos protectores que deben eliminarse, también es susceptible de escisión, dando lugar así a la CPT no modificada. De hecho, la razón de utilizar un grupo protector metoxitritilo (MMT) ligeramente extraíble para la cadena lateral de lisina de la molécula enlazadora, tal 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" estaba intacto.

[0063] Un enfoque alternativo consiste en proteger la posición 10-hidroxi del análogo de CPT con un grupo distinto de "BOC", de manera que el producto final esté listo para la conjugación con anticuerpos sin necesidad de desproteger el grupo protector 10-OH. El grupo protector 10-hidroxi, que convierte el 10-OH en un carbonato fenólico o un éster fenólico, se desprotege fácilmente en condiciones de pH fisiológico o por esterasas tras la administración *in vivo* del conjugado. 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)). Un grupo protector 10-hidroxi en SN-38 puede ser 'COR' donde R puede ser un alquilo

- 5 sustituido como "N(CH₃)₂-(CH₂)_n-" donde n es 1-10 y donde el grupo amino terminal está opcionalmente en forma de sal cuaternaria para mejorar la solubilidad acuosa, 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 por tratamiento con el clorofornato del reactivo elegido, si el derivado final ha de ser un carbonato. Típicamente, la 10-hidroxi-conteniendo camptotecina tal como SN-38 se trata con un equivalente molar del clorofornato en dimetilformamida usando trietilamina como la base. En estas condiciones, la posición 20-OH no se ve afectada. Para la formación de ésteres 10-O se utiliza el cloruro ácido del reactivo elegido.
- 10 **[0064]** En un proceso de preparación de un conjugado de un derivado farmacológico y un anticuerpo de la fórmula general 2, en el que los descriptores L2, L1, AA y A-X son los descritos en secciones anteriores, se prepara primero la fracción farmacológica bifuncional, [L2]-[L1]-[AA]_m-[A-X]-Fármaco, seguida de la conjugación de la fracción farmacológica bifuncional con la fracción diana, TM.
- 15 **[0065]** En un proceso de preparación de un conjugado de un derivado farmacológico y un anticuerpo de la fórmula general 2, en el que los descriptores L2, L1, AA y A-OH son los descritos en secciones anteriores, la fracción farmacológica bifuncional se prepara uniendo primero A-OH al extremo C de AA mediante un enlace amida, seguido del acoplamiento del extremo amina de AA a un grupo ácido carboxílico de L1. Si no hay AA (es decir, m = 0), el A-OH se une directamente a L1 mediante un enlace amida. El reticulante, [L1]-[AA]_m-[A-OH], se une al grupo hidroxilo o amino del fármaco, y a continuación se une a la fracción L1, recurriendo a la reacción entre los grupos azida (o acetileno) y acetileno (o azida) en L1 y L2 mediante química de clic.
- 20 **[0066]** En una forma de realización, la fracción diana, TM, es un anticuerpo monoclonal (MAb). En otra forma de realización, la fracción diana puede ser un MAb multivalente y/o multiespecífica. La fracción diana 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 simple), o de un isotipo IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4, IgA, o submoléculas de los mismos.
- 25 **[0067]** En una forma de realización preferida, la fracción diana es un anticuerpo monoclonal 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, un carcinoma, un sarcoma, un melanoma o un tumor glial. Una neoplasia maligna preferida a tratar según la presente invención es un tumor sólido maligno o una neoplasia hematopoyética.
- 30 **[0068]** En una forma de realización preferida, la fracción clivable intracelularmente puede ser escindida después de ser internalizada en la célula tras la unión del conjugado MAb-fármaco a un receptor de la misma, y particularmente escindida por esterasas y peptidasas.
- 35 **[0069]** La fracción diana es un anticuerpo (incluidos anticuerpos totalmente humanos, no humanos, humanizados o quiméricos) o un fragmento de anticuerpo (incluidos fragmentos producidos enzimáticamente o recombinantemente) o proteínas de unión que incorporan secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos, fragmentos y proteínas de unión pueden ser multivalentes y multiespecíficos o multivalentes y mono-específicos, como se ha definido anteriormente.
- 40 **Técnicas Generales de Anticuerpos**
- 45 **[0070]** Las técnicas para preparar anticuerpos monoclonales contra prácticamente cualquier antígeno diana son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975), y Coligan et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991). Brevemente, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse inyectando a ratones una composición que comprenda un antígeno, extirpando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que produzcan anticuerpos contra el antígeno, cultivando los clones que produzcan anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridomas.
- 50 **[0071]** Los MAbs pueden aislarse y purificarse a partir de cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen la cromatografía de afinidad con Proteína-A o Proteína-G Sepharose, la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y 2.9.1-2.9.3. Véase también Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).
- 55 **[0072]** Tras la obtención inicial de anticuerpos contra el inmunógeno, los anticuerpos pueden secuenciarse y prepararse posteriormente mediante técnicas recombinantes. La humanización y quimerización de anticuerpos murinos y fragmentos de anticuerpos son bien conocidas por los expertos en la materia, como se expone a continuación.
- 60 **[0073]** El experto se dará cuenta de que los métodos y composiciones reivindicados pueden utilizar cualquiera de una amplia variedad de anticuerpos conocidos en la técnica. Los anticuerpos utilizados pueden obtenerse comercialmente de una amplia variedad de fuentes conocidas. Por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)
- 65

5 dispone de una gran variedad de líneas de hibridoma secretoras de anticuerpos. Un gran número de anticuerpos contra
diversas dianas de enfermedades, incluyendo pero no limitándose a antígenos asociados a tumores, han sido depositados
en el ATCC y/o tienen secuencias de región variable publicadas y están disponibles para su uso en los métodos y
composiciones reivindicados. Véase, por ejemplo, Patente de EEUU. Nº.
7,312,318; 7,282,567; 7,151,164; 7,074,403; 7,060,802; 7,056,509; 7,049,060; 7,045,132; 7,041,803; 7,041,802; 7,041,2
93; 7,038,018; 7,037,498; 7,012,133; 7,001,598; 6,998,468; 6,994,976; 6,994,852; 6,989,241; 6,974,863; 6,965,018; 6,9
64,854; 6,962,981; 6,962,813; 6,956,107; 6,951,924; 6,949,244; 6,946,129; 6,943,020; 6,939,547; 6,921,645; 6,921,645;
6,921,533; 6,919,433; 6,919,078; 6,916,475; 6,905,681; 6,899,879; 6,893,625; 6,887,468; 6,887,466; 6,884,594; 6,881,
10 405; 6,878,812; 6,875,580; 6,872,568; 6,867,006; 6,864,062; 6,861,511; 6,861,227; 6,861,226; 6,838,282; 6,835,549; 6,
835,370; 6,824,780; 6,824,778; 6,812,206; 6,793,924; 6,783,758; 6,770,450; 6,767,711; 6,764,688; 6,764,681; 6,764,67
9; 6,743,898; 6,733,981; 6,730,307; 6,720,15; 6,716,966; 6,709,653; 6,693,176; 6,692,908; 6,689,607; 6,689,362; 6,689,
355; 6,682,737; 6,682,736; 6,682,734; 6,673,344; 6,653,104; 6,652,852; 6,635,482; 6,630,144; 6,610,833; 6,610,294; 6,
605,441; 6,605,279; 6,596,852; 6,592,868; 6,576,745; 6,572,856; 6,566,076; 6,562,618; 6,545,130; 6,544,749; 6,534,05
8; 6,528,625; 6,528,269; 6,521,227; 6,518,404; 6,511,665; 6,491,915; 6,488,930; 6,482,598; 6,482,408; 6,479,247; 6,46
15 8,531; 6,468,529; 6,465,173; 6,461,823; 6,458,356; 6,455,044; 6,455,040; 6,451,310; 6,444,206; 6,441,143; 6,432,404;
6,432,402; 6,419,928; 6,413,726; 6,406,694; 6,403,770; 6,403,091; 6,395,276; 6,395,274; 6,387,350; 6,383,759; 6,383,4
84; 6,376,654; 6,372,215; 6,359,126; 6,355,481; 6,355,444; 6,355,245; 6,355,244; 6,346,246; 6,344,198; 6,340,571; 6,3
40,459; 6,331,175; 6,306,393; 6,254,868; 6,187,287; 6,183,744; 6,129,914; 6,120,767; 6,096,289; 6,077,499; 5,922,302;
5,874,540; 5,814,440; 5,798,229; 5,789,554; 5,776,456; 5,736,119; 5,716,595; 5,677,136; 5,587,459; 5,443,953; 5,525,
20 338. Éstos son sólo ejemplos y en la técnica se conoce una amplia variedad de otros anticuerpos y sus hibridomas. El
experto se dará cuenta de que pueden obtenerse secuencias de anticuerpos o hibridomas secretores de anticuerpos
contra casi cualquier antígeno asociado a una enfermedad mediante una simple búsqueda en las bases de datos ATCC,
NCBI y/o USPTO de anticuerpos contra una diana de interés seleccionada asociada a una enfermedad. Los dominios de
unión a antígeno de los anticuerpos clonados pueden amplificarse, extirparse, ligarse a un vector de expresión,
25 transfectarse a una célula huésped adaptada y utilizarse para la producción de proteínas, utilizando técnicas estándar
bien conocidas en la técnica. Los anticuerpos aislados pueden conjugarse con agentes terapéuticos, como las
camptotecinas, mediante las técnicas aquí descritas.

30 *Anticuerpos Quiméricos y Humanizados*

[0074] 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, incluidas 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
35 quiméricos son bien conocidos en la técnica (*por ejemplo*, Leung et al., 1994, *Hibridoma* 13:469).

[0075] 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 variables (FR) de ratón en el anticuerpo monoclonal quimérico también se sustituyen por secuencias FR
40 humanas. Para preservar la estabilidad y la especificidad antigénica del monoclonal humanizado, uno o más residuos FR
humanos pueden sustituirse por los residuos homólogos de ratón. Los anticuerpos monoclonales humanizados pueden
utilizarse para el tratamiento terapéutico de sujetos. 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*,
45 89:4285; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.*, 1992, 12:437; Tempest et al., 1991, *Biotechnology* 9:266; Singer et al., *J. Immun.*,
1993, 150:2844).

[0076] Otras formas de realización pueden referirse a anticuerpos contra primates no humanos. Pueden encontrarse
técnicas generales para criar anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos, 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
50 anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos pueden obtenerse de ratones transgénicos que han sido diseñados
para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una provocación antigénica, como se explica más
adelante.

55 *Anticuerpos Humanos*

[0077] Los métodos para producir anticuerpos totalmente humanos utilizando enfoques combinatorios o animales
transgénicos transformados con loci de inmunoglobulina humana son conocidos en la técnica (*p. ej.*, Mancini et al., 2004,
New Microbiol. 27:315-28; Conrad and Scheller, 2005, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:117-26; Brekke y Loset,
60 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, los métodos y procedimientos reivindicados pueden utilizar
anticuerpos humanos producidos mediante dichas técnicas.

[0078] En una alternativa, la técnica de expresión en fago puede utilizarse 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 seres humanos normales o de seres humanos que presenten un determinado estado de enfermedad, 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.

5 **[0079]** En un ejemplo no limitativo de esta metodología, Dantas-Barbosa et al. (2005) construyeron una biblioteca de expresión en fago de fragmentos de anticuerpos Fab humanos procedentes de pacientes con osteosarcoma. En general, el ARN total se obtuvo a partir de linfocitos sanguíneos circulantes (*Id.*). Se clonaron Fab recombinantes de los repertorios de anticuerpos de cadena μ , γ y κ y se insertaron en una biblioteca de expresión en fago (*Id.*). Los ARN se convirtieron en ADNc y se utilizaron para hacer bibliotecas de ADNc de Fab utilizando 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 bibliotecas se realizó según Andris-Widhopf et al. (2000, In: *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 dirigieron con endonucleasas de restricción y se insertaron en el genoma del bacteriófago para formar la biblioteca de expresión en fago. Dichas bibliotecas pueden seleccionarse mediante métodos estándar de expresión en fago. El experto se dará cuenta de que esta técnica es sólo ejemplar y que puede utilizarse cualquier método conocido para fabricar y cribar anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos mediante expresión en fago.

20 **[0080]** En otra alternativa, los animales transgénicos que han sido modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos pueden utilizarse para generar anticuerpos contra esencialmente cualquier diana inmunogénica, utilizando protocolos de inmunización estándar como se ha comentado anteriormente. 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 ejemplo no limitativo de dicho sistema es el XenoMouse® (*p. ej.*, 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.

30 **[0081]** 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, incluida la mayoría de las secuencias de la región variable, junto con genes accesorios y secuencias reguladoras. El repertorio de regiones variables humanas puede utilizarse 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 cosecharse y/o producirse mediante las técnicas estándar comentadas anteriormente. Se dispone de diversas cepas de XenoMouse®, cada una de las cuales es capaz de producir una clase diferente de anticuerpos. Se ha demostrado que los anticuerpos humanos producidos transgénicamente tienen potencial terapéutico, al tiempo que conservan las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos humanos normales (Green et al., 1999). El experto se dará 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 modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos.

40 *Producción de Fragmentos de Anticuerpos*

45 **[0082]** Algunas formas de realización de los métodos y/o composiciones reivindicados pueden referirse a fragmentos de anticuerpos. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse, por ejemplo, por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un $F(ab)_2$ de fragmento 5S denotado. Este fragmento puede escindirse aún más utilizando un agente reductor tiol y, opcionalmente, un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Alternativamente, una escisión enzimática con pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc. Métodos ejemplares para producir fragmentos de anticuerpos se describen en Patente de EE. UU. N.º 4.036.945; Patente de EE. UU. No. 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).

55 **[0083]** También pueden utilizarse otros métodos de escisión de anticuerpos, como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, la escisión posterior 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 estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas por productos químicos como el glutaraldehído. Véase Sandhu, 1992, *Crit. Rev. Biotech.*, 12:437.

60 **[0084]** Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de cadena única de unión a antígeno (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L , conectados por una secuencia enlazadora 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 enlazador que une los dos

dominios V. Los métodos para producir scFvs 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 EE. UU. N.º. 4.946.778; Pack et al., 1993, *Bio/Technology*, 11:1271, y Sandhu, 1992, *Crit. Rev. Biotech.*, 12:437.

5 **[0085]** Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de dominio único (dAb), En ocasiones denominado anticuerpo de cadena única. Las técnicas para producir anticuerpos de dominio único son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Cossins et al., *Protein Expression and Purification*, 2007, 51:253-59; Shuntao et al., *Molec Immunol* 2006, 43:1912-19; Tanha et al., *J. Biol. Chem.* 2001, 276:24774-780). Otros tipos de fragmentos de anticuerpos pueden comprender una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden obtenerse construyendo genes que codifiquen las CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, utilizando 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.)

Variaciones de Anticuerpos

20 **[0086]** En ciertas formas de realización, las secuencias de anticuerpos, como las porciones Fc de anticuerpos, pueden variarse para optimizar las características fisiológicas de los conjugados, como la vida media en suero. Los métodos de sustitución de secuencias de aminoácidos en proteínas son ampliamente conocidos en la técnica, como la mutagénesis dirigida al lugar (por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 2nd Ed, 1989). En realizaciones preferidas, la variación puede implicar la adición o eliminación de uno o más sitios de glicosilación en la secuencia Fc (p. ej., Patente de EEUU. N.º 6.254.868). En otras realizaciones preferidas, pueden efectuarse sustituciones de aminoácidos específicas en la secuencia Fc (p. ej., Hornick et al., 2000, *J Nucl Med* 41:355-62; Hinton et al., 2006, *J Immunol* 176:346-56; Petkova et al. 2006, *Int Immunol* 18:1759-69; Patente de EEUU N.º 7.217.797).

Anticuerpos Biespecíficos y Multiespecíficos

30 **[0087]** Los anticuerpos biespecíficos son útiles en una serie de aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico con sitios de unión para un antígeno de superficie de células tumorales y para un receptor de superficie de células T puede dirigir la lisis de células tumorales específicas por células T. Los anticuerpos biespecíficos que reconocen los gliomas y el epitopo CD3 de las células T se han utilizado con éxito en el tratamiento de tumores cerebrales en pacientes humanos (Nitta, et al. *Lancet*. 1990; 355:368-371). En ciertas formas de realización, las técnicas y composiciones para la conjugación de agentes terapéuticos aquí descritas pueden utilizarse con anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos como fracciones diana.

40 **[0088]** Se conocen numerosos métodos para producir anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, como los descritos, por ejemplo, en Patente de EEUU N.º 7.405.320. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por el método del cuádruma, que implica la fusión de dos hibridomas diferentes, cada uno de los cuales produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio antigénico diferente (Milstein y Cuello, *Nature*, 1983; 305:537-540).

45 **[0089]** Otro método para producir anticuerpos biespecíficos utiliza reticulantes heterobifuncionales para unir químicamente dos anticuerpos monoclonales diferentes (Staerz, et al. *Nature*. 1985; 314:628-631; Perez, et al. *Nature*. 1985; 316:354-356). Los anticuerpos biespecíficos también pueden producirse mediante la reducción de cada uno de los dos anticuerpos monoclonales parentales a las respectivas medias moléculas, que luego se mezclan y se dejan reoxidar para obtener la estructura híbrida (Staerz y Bevan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83:1453-1457). Otra alternativa consiste en entrecruzar químicamente dos o tres fragmentos Fab' purificados por separado utilizando los enlazadores adecuados. (Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea 0453082).

50 **[0090]** Otros métodos incluyen la mejora de la eficacia de la generación de hibridomas híbridos mediante la transferencia genética de marcadores seleccionables distintos a través de vectores lanzadera derivados de retrovirus a los respectivos hibridomas parentales, que se fusionan posteriormente (DeMonte, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87:2941-2945); o transfección de una línea celular de hibridoma con plásmidos de expresión que contengan los genes de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo diferente.

60 **[0091]** Los dominios V_H y V_L cognados pueden unirse con un enlazador peptídico de composición y longitud apropiadas (normalmente compuesto por más de 12 residuos de aminoácidos) para formar un Fv de cadena única (scFv) con actividad de unión. Los métodos de fabricación de scFvs se describen en Patente de EE. UU. No. 4.946.778 y Patente de EE. UU. N.º 5.132.405. La reducción de la longitud del enlace peptídico a menos de 12 residuos de aminoácidos impide el emparejamiento de los dominios V_H y V_L en la misma cadena y fuerza el emparejamiento de los dominios V_H y V_L con dominios complementarios en otras cadenas, lo que da lugar a la formación de multímeros funcionales. Las cadenas polipeptídicas de los dominios V_H y V_L que se unen con enlaces de entre 3 y 12 residuos de aminoácidos forman predominantemente dímeros (denominados diabodies). Con enlazadores entre 0 y 2 residuos de aminoácidos, se favorecen los trímeros (denominados tri-cuerpo) y los tetrámeros (denominados tetracuerpo), pero los patrones exactos de oligomerización parecen depender de la composición así como de la orientación de los dominios V (V_H-enlazador-V_L o

V_L-enlazador-V_H), además de la longitud del enlazador.

[0092] Estas técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos presentan varias dificultades en términos de bajo rendimiento, necesidad de purificación, baja estabilidad o laboriosidad de la técnica. Más recientemente, se ha utilizado una técnica conocida como "dock and lock" (DNL) para producir combinaciones de prácticamente cualquier anticuerpo deseado, fragmentos de anticuerpo y otras moléculas efectoras (véase, por ejemplo, Patente de EEUU. Nº. 7.550.143; 7.521.056; 7.534.866; 7.527.787 y USSN 11/925.408). La técnica utiliza dominios complementarios de unión a proteínas, denominados dominios de anclaje (AD) y dominios de dimerización y acoplamiento (DDD), que se unen entre sí y permiten el ensamblaje de estructuras complejas, que van desde dímeros, trímeros, tetrámeros, quintámeros y hexámeros. Estos forman complejos estables de alto rendimiento sin necesidad de una purificación exhaustiva. La técnica DNL permite ensamblar anticuerpos mono-específicos, biespecíficos o multiespecíficos. Cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica para fabricar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos puede utilizarse en la práctica de los métodos actualmente reivindicados.

[0093] En varias formas de realización, un conjugado como el aquí descrito puede formar parte de un anticuerpo compuesto multiespecífico. Dichos anticuerpos pueden contener dos o más sitios de unión a antígenos diferentes, con distintas especificidades. El compuesto multiespecífico puede unirse a diferentes epítomos del mismo antígeno, o alternativamente puede unirse a dos antígenos diferentes. Algunas de las combinaciones de objetivos más preferidas son las que figuran en la Tabla 1. Esta es una lista de ejemplos de combinaciones preferidas, pero no pretende ser exhaustiva.

Tabla 1. Algunos Ejemplos de anticuerpos multiespecíficos.

Primer objetivo	Segundo objetivo
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	Quimiocinas efectoras proinflamatorias, 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	Proteína reguladora 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	Quimiocinas efectoras proinflamatorias, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A, o MIP-1B
TNF- α	Receptor 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	Citocinas efectoras proinflamatorias, especialmente MIF, HMGB-1, TNF- α , IL-1, o IL-6
LPS	Quimiocinas efectoras proinflamatorias, 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	Citocinas efectoras proinflamatorias, especialmente MIF, HMGB-1, TNF- α , IL-1, o IL-6
TF o trombina	Quimiocinas efectoras proinflamatorias, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A, o MIP-1B
TF o trombina	Receptor 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

5

10

15

[0094] Otras combinaciones, 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 (p. ej., RS-7) + ILGF, anticuerpos CEACAM5 + EGFR. Dichos anticuerpos no sólo deben utilizarse en combinación, sino que pueden combinarse como proteínas de fusión de diversas formas, como IgG, Fab, scFv y similares, tal como se describe en Patente de EEUU. N.º. 6,083,477; 6,183,744 y 6,962,702 y Publicación de la Solicitud de Patente de EEUU. N.º. 20030124058; 20030219433; 20040001825; 20040202666; 20040219156; 20040219203; 20040235065; 20050002945; 20050014207; 20050025709; 20050079184; 20050169926; 20050175582; 20050249738; 20060014245 y 2006003475.

Antígenos Diana y Anticuerpos Ejemplares

20

25

30

35

[0095] En una forma de realización preferida, se utilizan anticuerpos 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 MAb 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 MAb: LL1 (anti-CD74), LL2 y RFB4 (anti-CD22), RS7 (antiglicoproteína epitelial-1 (EGP-1)), PAM4 y KC4 (ambos antimucina), MN-14 (antígeno anticarcinoembrionario (CEA, también conocido como CD66e), Mu-9 (antígeno-p específico del colon), Immu 31 (antialfa-fetoproteína), TAG-72 (p. ej., CC49), Tn, J591 o HuJ591 (anti-PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), AB-PG1-XG1-026 (dímero anti-PSMA), CC49), Tn, J591 o HuJ591 (anti-PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata)), AB-PG1-XG1-026 (dímero anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (MAb anti-anhidrasa carbónica IX) y hL243 (anti-HLA-DR). Tales anticuerpos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Patente de EEUU. N.º. 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 Publ. de Solicitud de Patente No. 20040185053; 20040202666; 20050271671; 20060193865; 20060210475; 20070087001) Los anticuerpos específicos conocidos de uso incluyen hPAM4 (Patente de EEUU. N.º. 7,282,567), hA20 (Patente de EEUU. N.º. 7,251,164), hA19 (Patente de EEUU. N.º. 7,109,304), hIMMU31 (Patente de EEUU. N.º. 7,300,655), hLL1 (Patente de EEUU. N.º. 7,312,318), hLL2 (Patente de EEUU. N.º. 7,074,403), hMu-9 (Patente de EEUU. N.º. 7,387,773), hL243 (Patente de EEUU. N.º. 7,612,180), hMN-14 (Patente de EEUU. N.º. 6,676,924), hMN-15 (Patente de EEUU. N.º. 7,541,440), hR1 (Solicitud de Patente Provisional de EEUU. 61/145,896), hRS7 (Patente de EEUU. N.º. 7,238,785), hMN-3 (Patente de EEUU. N.º. 7,541,440), AB-PG1-XG1-026 (Solicitud de patente 11/983,372, depositada como ATCC PTA-4405 y PTA-4406) y D2/B (WO 2009/130575).

40

45

50

55

[0096] Otros antígenos útiles a los que pueden dirigirse los conjugados descritos incluyen la anhidrasa carbónica IX, B7, CCCL19, CCCL21, CSAP, *HER-2/neu*, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20 (p. ej., C2B8, hA20, 1F5 MAb), CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM5, CEACAM-6, alfa-fetoproteína (AFP), VEGF (e.p. ej. *AVASTIN*[®], variante de empalme de fibronectina), fibronectina ED-B (p. ej., L19), EGP-1, EGP-2 (p. ej., 17-1A), receptor del EGF (ErbB1) (p. ej., ERBITUX[®]), ErbB2, ErbB3, Factor H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, Ga 733, GROB, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF), HM1.24, *HER-2/neu*, factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-2R, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, IGF-1R, Ia, HM1.24, gangliósidos, HCG, el antígeno HLA-DR al que se une L243, antígenos CD66, es decir, CD66a-d o una combinación de los mismos, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, factor de crecimiento placentario (PIGF), PSA (antígeno prostático específico), PSMA, antígeno PAM4, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM, KS-1, Le(y), mesotelina, S100, tenascina, TAC, antígeno Tn, antígenos Thomas-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, antígenos de angiogénesis tumoral, TNF- α , receptor TRAIL (R1 y R2), VEGFR, RANTES, T101, así como antígenos de células madre cancerosas, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5 y un producto oncogénico.

60

65

[0097] Los antígenos CD66 consisten en cinco glicoproteínas diferentes con estructuras similares, CD66a-e, codificadas por los miembros de la familia 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 tubo digestivo y células tumorales de diversos 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). Varios de los antígenos antes mencionados se divulgan en Solicitud provisional N.º. de Serie 60/426,379, titulada "Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics", depositada el 15 de noviembre de 2002. Las células madre cancerosas, a las que se atribuye ser poblaciones de células malignas precursoras más resistentes a las terapias (Gan, J Cell Mol.

Med. 5 de diciembre de 2007 [publicación electrónica antes de impresión]; Hill y Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99(19):1435-40), tienen antígenos que pueden ser diana en determinados 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 no microcítico (Donnenberg et al., J. Control Release 2007; 122(3):385-91) y glioblastoma (Beier et al., Cancer Res. 2007; 67(9):4010-5), y CD44 en el cáncer colorrectal (Dalerba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(24):10158-63), cáncer de páncreas (Li et al., Cancer Res. 2007; 67(3):1030-7), y en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Prince et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(3):973-8).

[0098] En la terapia del mieloma múltiple, se han descrito anticuerpos de marcación 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 ahead of print), y CD40 (Tai et al., 2005; Cancer Res. 65(13):5898-5906).

[0099] Un análisis exhaustivo reciente de dianas antigénicas adecuadas (designación de clúster, o CD) en células hematopoyéticas malignas, mostrado mediante citometría de flujo y que puede servir de guía para seleccionar anticuerpos adecuados para inmunoterapia conjugada con fármacos, es el de Craig y Foon, Blood prepublicado en línea el 15 de enero de 2008; DOL 10.1182/blood-2007-11-120535.

[0100] En otra forma de realización preferida, se utilizan anticuerpos que se internalizan rápidamente y luego se reexpresan, procesan y presentan en las superficies celulares, lo que permite la captación continua y la acumulación 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) (véase, por ejemplo, Patente de EEUU. N.º 6,653,104; 7,312,318). 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. Una revisión del uso de anticuerpos CD74 en el cáncer se encuentra en Stein et al., Clin Cancer Res. 2007 Sep 15;13(18 Pt 2):5556s-5563s.

[0101] Las enfermedades que se tratan preferentemente con anticuerpos anti-CD74 incluyen, entre otras, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, melanoma, cáncer de pulmón, renal, colónico, glioblastoma multiforme, histiocitomas, leucemias mieloides y mieloma múltiple. La expresión continua del antígeno CD74 durante breves periodos de tiempo en la superficie de las células de marcación, seguida de la internalización del antígeno, y la reexpresión del antígeno, permite que el anticuerpo LL1 de marcación 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 circulan a través de los lisosomas y endosomas, y la fracción quimioterapéutica se libera en forma activa dentro de las células diana.

Dock-and-Lock (DNL)

[0102] En ciertas formas de realización preferidas, los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos pueden producirse utilizando la tecnología dock-and-lock (véase, por ejemplo, Patente de EEUU. N.º 7,521,056; 7,550,143; 7,534,866; 7,527,787 y Solicitud de Patente de EEUU. N.º 11/925.408). El método DNL explota las interacciones proteína/proteína específicas que se producen entre las subunidades reguladoras (R) de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y el dominio de anclaje (AD) de las proteínas de anclaje de la A-cinasa (AKAPs) (Baillie et al., FEBS Letters. 2005; 579:3264. Wong y Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959). La PKA, que desempeña un papel central en una de las vías de transducción de señales mejor estudiadas, desencadenada por la unión del segundo mensajero AMPc a las subunidades R, se aisló por primera vez del músculo esquelético de conejo en 1968 (Walsh et al., J. Biol. Chem. 1968;243:3763). La estructura de la holoenzima consta de dos subunidades catalíticas mantenidas en forma inactiva por las subunidades R (Taylor, J. Biol. Chem. 1989;264:8443). Las isozimas de la PKA se encuentran con dos tipos de subunidades R (RI y RII), y cada tipo tiene isoformas α y β (Scott, Pharmacol. Ther. 1991;50:123). Las subunidades R sólo se han aislado como dímeros estables y se ha demostrado que el dominio de dimerización consiste en los primeros 44 residuos aminoterminales (Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999; 6:222). La unión del AMPc a las subunidades R conduce a la liberación de subunidades catalíticas activas para un amplio espectro de actividades de serina/treonina cinasa, que se orientan hacia sustratos seleccionados mediante la compartimentación de la PKA a través de su acoplamiento con las AKAP (Scott et al., J. Biol. Chem. 1990;265:21561)

[0103] Desde que se caracterizó la primera AKAP, la proteína-2 asociada a microtúbulos, en 1984 (Lohmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984;81:6723), se han identificado más de 50 AKAP que se localizan en diversos sitios subcelulares, como la membrana plasmática, el citoesqueleto de actina, el núcleo, las mitocondrias y el retículo endoplásmico, con estructuras diversas en especies que van desde la levadura hasta el ser humano (Wong y Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004;5:959). El AD de AKAP para PKA es una hélice anfipática de 14-18 residuos (Carr et al., J. Biol. Chem. 1991;266:14188). Las secuencias de aminoácidos del AD son muy variadas entre los AKAP individuales, y las afinidades de unión comunicadas para los dímeros RII oscilan entre 2 y 90 nM (Alto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003;100:4445). Curiosamente, las AKAP sólo se unen a subunidades R díméricas. En el caso del RII α humano, el AD se une a una superficie hidrofóbica formada por los 23 residuos aminoterminales (Colledge y Scott, Trends Cell Biol. 1999; 6:216). Así, el dominio de dimerización y el dominio de unión a AKAP del RII α humano se encuentran en la misma secuencia N-terminal de 44 aminoácidos (Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999;6:222; Newlon et al., EMBO J. 2001;20:1651), que aquí

se denomina DDD.

5 **[0104]** Hemos desarrollado una tecnología de plataforma para utilizar el DDD del RII α humano y el AD de una determinada
 10 secuencia de aminoácidos como un excelente par de módulos enlazadores para acoplar dos entidades cualesquiera,
 denominadas en lo sucesivo **A** y **B**, en un complejo no covalente, que podría bloquearse aún más en una estructura
 establemente unida mediante la introducción de residuos de cisteína tanto en el DDD como en el AD en posiciones
 estratégicas para facilitar la formación de enlaces disulfuro. La metodología general del enfoque "dock-and-lock" es la
 siguiente. La entidad **A** se construye enlazando una secuencia DDD a un precursor de **A**, **lo** que da lugar a un primer
 15 componente denominado en lo sucesivo **a**. Dado que la secuencia DDD provocaría la formación espontánea de un dímero,
A estaría compuesto por **a₂**. La entidad **B** se construye enlazando una secuencia AD a un precursor **de B**, **lo** que da lugar
 a un segundo componente denominado en lo sucesivo **b**. El motivo dimérico de DDD contenido en **a₂** creará un sitio de
 acoplamiento para la unión a la secuencia AD contenida en **b**, facilitando así una fácil asociación de **a₂** y **b** para formar un
 complejo trimérico binario compuesto por **a₂b**. Este evento de unión se hace irreversible con una reacción posterior para
 20 asegurar covalentemente las dos entidades a través de puentes disulfuro, que se produce muy eficientemente basándose
 en el principio de concentración local efectiva porque las interacciones de unión iniciales deben poner en proximidad los
 grupos tiol reactivos colocados tanto en la DDD como en la AD (Chimura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001;98:8480)
 para ligar específicamente al sitio.

20 **[0105]** Al ligar el DDD y el AD lejos de los grupos funcionales de los dos precursores, también se espera que tales
 ligaciones de sitio específico preserven las actividades originales de los dos precursores. Este enfoque es de naturaleza
 modular y puede aplicarse potencialmente para enlazar, de forma específica y covalente, una amplia gama de sustancias,
 incluidos péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras moléculas efectoras con una amplia gama
 de actividades. Utilizando el método de la proteína de fusión para construir efectores conjugados AD y DDD, prácticamente
 cualquier proteína o péptido puede incorporarse a una construcción DNL. Sin embargo, la técnica no es limitativa y pueden
 25 utilizarse otros métodos de conjugación.

30 **[0106]** Se conoce una variedad de métodos para hacer proteínas de fusión, incluyendo síntesis de ácido nucleico,
 hibridación y/o amplificación para producir un ácido nucleico sintético de doble cadena que codifica una proteína de fusión
 de interés. Dichos ácidos nucleicos bicatenarios pueden insertarse en vectores de expresión para la producción de
 proteínas de fusión mediante técnicas estándar de biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular
 Cloning, A laboratory manual, 2nd Ed, 1989). En tales realizaciones preferidas, la fracción AD y/o DDD puede unirse al
 extremo N-terminal o C-terminal de una proteína o péptido efector, como un anticuerpo o fragmento. Sin embargo, el
 experto se dará cuenta de que el sitio de unión de una fracción AD o DDD a una fracción efectora puede variar,
 dependiendo de la naturaleza química de la fracción efectora y de la(s) parte(s) de la fracción efectora implicada(s) en su
 35 actividad fisiológica. La unión específica de una variedad de moléculas efectoras puede realizarse mediante técnicas
 conocidas en la técnica, como el uso de reactivos de reticulación bivalentes y/u otras técnicas de conjugación química.

40 **[0107]** En una forma de realización preferida, las proteínas de fusión se ensamblan mediante las técnicas de acoplamiento
 y bloqueo (DNL) descritas en, p. ej., Rossi EA, et al., Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:6841-6846; Patente de EEUU.
 N.º 7,521,056; 7,550,143; 7,534,866; 7,527,787 y Solicitud de Patente de EEUU. N.º 11/925.408. A continuación se
 describen secuencias DDD y AD ejemplares que pueden utilizarse en el método DNL para formar complejos sintéticos.

45 DDD1
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:1)
 DDD2
 CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:2)
 AD1
 QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID N.º:3)
 AD2
 50 CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID N.º:4)

Variantes de Secuencia DNL

55 **[0108]** En formas de realización alternativas, pueden utilizarse variantes de secuencia de los elementos AD y/o DDD en
 la construcción de los complejos DNL. Las relaciones estructura-función de los dominios AD y DDD han sido objeto de
 investigación. (Véanse, por ejemplo, Burns-Hamuro et al., 2005, Protein Sci 14:2982-92; Carr et al., 2001, J Biol Chem
 276:17332-38; Alto et al., 2003, Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50; Hundsrucker et al, 2006, Biochem J 396:297-306;
 Stokka et al., 2006, Biochem J 400:493-99; Gold et al., 2006, Mol Cell 24:383-95; Kinderman et al., 2006, Mol Cell 24:397-
 60 408).

65 **[0109]** Por ejemplo, Kinderman et al. (2006) examinaron la estructura cristalina de la interacción de unión AD-DDD y
 concluyeron que la secuencia DDD humana contenía una serie de residuos de aminoácidos conservados que eran
 importantes en la formación de dímeros o en la unión AKAP, subrayados en SEQ ID N.º:1 a continuación. (Véase la figura
 1 de Kinderman et al., 2006). El experto se dará cuenta de que al diseñar variantes de secuencia de la secuencia DDD,
 sería deseable evitar cambiar cualquiera de los residuos subrayados, mientras que podrían hacerse sustituciones
 conservadoras de aminoácidos para residuos que son menos críticos para la dimerización y la unión a AKAP.

Secuencia DDD humana de la proteína quinasa A

SHIQIPPLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N°:1)

5 **[0110]** Alto et al. (2003) realizaron un análisis bioinformático de la secuencia AD de varias proteínas AKAP para diseñar una secuencia AD selectiva para RII denominada AKAP-IS (SEQ ID N°:5), con una constante de unión para DDD de 0,4 nM. La secuencia AKAP-IS se diseñó como un péptido antagonista de la unión de AKAP a PKA. Los residuos de la secuencia AKAP-IS en los que las sustituciones tendían a disminuir la unión a DDD aparecen subrayados en SEQ ID N°:3.

10

SECUENCIA AKAP-IS

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID N°:3)

15 **[0111]** De forma similar, Gold (2006) utilizó cristalografía y cribado de péptidos para desarrollar una secuencia SuperAKAP-IS (SEQ ID N°:5), que presenta una selectividad cinco órdenes de magnitud mayor para la isoforma RII de la PKA en comparación con la isoforma RI. Los residuos subrayados indican las posiciones de las sustituciones de aminoácidos, en relación con la secuencia AKAP-IS, que aumentaron la unión a la fracción DDD de RII α . En esta secuencia, el residuo N-terminal Q se numera como residuo número 4 y el residuo C-terminal A es el residuo número 20. Los residuos en los que se podían realizar sustituciones para afectar a la afinidad por RII α eran los residuos 8, 11, 15, 16, 18, 19 y 20 (Gold et al., 2006). Se contempla que en ciertas realizaciones alternativas, la secuencia SuperAKAP-IS puede sustituirse por la secuencia de fracción AD AKAP-IS para preparar construcciones DNL. Otras secuencias alternativas que podrían sustituirse por la secuencia AKAP-IS AD se muestran en SEQ ID N°:6-8. Las sustituciones relativas a la secuencia AKAP-IS están subrayadas. Se prevé que, al igual que con la secuencia AKAP-IS (SEQ ID N°:3), la fracción AD también puede incluir los residuos N-terminales adicionales cisteína y glicina y los residuos C-terminales glicina y cisteína, como se muestra en la SEQ ID N°:4.

30

SuperAKAP-IS

QIEYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID N°:5)

Secuencias AKAP alternativas

QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID N°:6)

QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID N°:7)

QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID N°:8)

35 **[0112]** Stokka et al. (2006) también desarrollaron competidores peptídicos de la unión de AKAP a PKA, mostrados en SEQ ID N°:9-11. Los péptidos antagonistas se designaron como Ht31 (SEQ ID N°:9), RIAD (SEQ ID N°:10) y PV-38 (SEQ ID N°:11). El péptido Ht-31 mostró una mayor afinidad por la isoforma RII de la PKA, mientras que el RIAD y el PV-38 mostraron una mayor afinidad por la RI.

40

Ht31

DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID N°:9)

RIAD

LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID N°:10)

PV-38

45

FEELAWKIAKMIWSDVFAQC (SEQ ID N°:11)

50 **[0113]** Hundsrucker et al. (2006) desarrollaron otros péptidos competidores de la unión de AKAP a PKA, con una constante de unión tan baja como 0,4 nM a la DDD de la forma RII de PKA. Las secuencias de varios péptidos antagonistas de AKAP figuran en la Tabla 1 de Hundsrucker et al. Los residuos altamente conservados entre los dominios AD de diferentes proteínas AKAP se indican a continuación subrayados con referencia a la secuencia AKAP IS. Los residuos son los mismos que los observados por Alto et al. (2003), con la adición del residuo de alanina C-terminal. (Véase FIG. 4 de Hundsrucker et al. (2006).) Las secuencias de antagonistas peptídicos con afinidades particularmente altas para la secuencia DDD de RII se muestran en SEQ ID N°:12-14.

55

AKAP-IS

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID N°:3)

AKAP7 δ -wt-pep

PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID N°:12)

AKAP7 δ -L304T-pep

60

PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID N°:13)

AKAP7 δ -L308D-pep

PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID N°:14)

65 **[0114]** Carr et al. (2001) examinaron el grado de homología de secuencia entre diferentes secuencias DDD de unión a AKAP de proteínas humanas y no humanas e identificaron residuos en las secuencias DDD que parecían ser los más altamente conservados entre diferentes motivos DDD. A continuación se indican mediante subrayado con referencia a la

secuencia PKA RII α DDD humana de SEQ ID N $^{\circ}$: 1. Los residuos especialmente conservados se indican además en cursiva. Los residuos coinciden, pero no son idénticos, a los sugeridos por Kinderman et al. (2006) es importante para la unión a las proteínas AKAP.
 SHIQ *IP P* *GL* *TELLQGYT V* *EVL R Q* *QP P* *DLVEFA VE* *YF* TR *LREA R* A (SEQ ID N $^{\circ}$: 1)

[0115] El experto se dará cuenta de que, en general, aquellos residuos de aminoácidos que están altamente conservados en las secuencias DDD y AD de diferentes proteínas son aquellos que puede preferirse que permanezcan constantes al hacer sustituciones de aminoácidos, mientras que los residuos que están menos altamente conservados pueden variarse más fácilmente para producir variantes de secuencia de las secuencias AD y/o DDD descritas en el presente documento.

Sustitución de Aminoácidos

[0116] En formas de realización alternativas, los métodos y composiciones divulgados pueden implicar la producción y el uso de proteínas o péptidos con uno o más residuos de aminoácidos sustituidos. Por ejemplo, las secuencias DDD y/o AD utilizadas para hacer construcciones DNL pueden modificarse como se ha comentado anteriormente.

[0117] El experto será consciente de que, en general, las sustituciones de aminoácidos implican típicamente la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de propiedades relativamente similares (es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos). Las propiedades de los distintos aminoácidos y el efecto de la sustitución de aminoácidos en la estructura y función de las proteínas han sido objeto de amplios estudios y conocimientos en la técnica.

[0118] Por ejemplo, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos (Kyte & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157: 105-132). El carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte & Doolittle, 1982), estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Al hacer sustituciones conservadoras, se prefiere el uso de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén dentro de ± 2 , dentro de ± 1 son más preferidos, y dentro de $\pm 0,5$ son aún más preferidos.

[0119] La sustitución de aminoácidos también puede tener en cuenta la hidrofiliidad del residuo de aminoácido (por ejemplo, Patente de EE. UU. N $^{\circ}$ 4.554.101). Se han asignado valores de hidrofiliidad a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0); glutamato (+3,0); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5,+,-,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se prefiere la sustitución de aminoácidos por otros de hidrofiliidad similar.

[0120] Otras consideraciones incluyen el tamaño de la cadena lateral del aminoácido. Por ejemplo, generalmente no sería preferible sustituir un aminoácido con una cadena lateral compacta, como la glicina o la serina, por un aminoácido con una cadena lateral voluminosa, como el triptófano o la tirosina. También hay que tener en cuenta el efecto de los distintos residuos de aminoácidos en la estructura secundaria de las proteínas. Mediante estudios empíricos, se ha determinado el efecto de diferentes residuos de aminoácidos sobre la tendencia de los dominios proteicos a adoptar una estructura secundaria alfa-hélice, beta-hoja o de giro inverso, y es conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Chou & Fasman, 1974, Biochemistry, 13:222-245; 1978, Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276; 1979, Biophys. J., 26:367-384).

[0121] Basándose en tales consideraciones y en un amplio estudio empírico, se han construido tablas de sustituciones conservadoras de aminoácidos que son conocidas en la técnica. Por ejemplo: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. Alternativamente: Ala (A) leu, ile, val; Arg (R) gln, asn, lys; Asn (N) his, asp, lys, arg, gln; Asp (D) asn, glu, Cys (C) ala, ser; Gln (Q) glu, asn; Glu (E) gln, asp; Gly (G) ala; His (H) asn, gln, lys, arg; Ile (I) val, met, ala, phe, leu; Leu (L) val, met, ala, phe, ile; Lys (K) gln, asn, arg; Met (M) phe, ile, leu; Phe (F) leu, val, ile, ala, tyr; Pro (P) ala; Ser (S), thr; Thr (T) ser; Trp (W) phe, tyr; Tyr (Y) trp, phe, thr, ser; Val (V) ile, leu, met, phe, ala.

[0122] Otras consideraciones para las sustituciones de aminoácidos incluyen si el residuo está localizado o no en el interior de una proteína o si está expuesto a disolventes. Para los residuos interiores, las sustituciones conservadoras incluirían: Asp y Asn; Ser y Thr; Ser y Ala; Thr y Ala; Ala y Gly; Ile y Val; Val y Leu; Leu e Ile; Leu y Met; Phe y Tyr; Tyr y Trp. (Véase, por ejemplo, el sitio web PROWL en rockefeller.edu) Para los residuos expuestos a disolventes, las sustituciones conservadoras incluirían: Asp y Asn; Asp y Glu; Glu y Gln; Glu y Ala; Gly y Asn; Ala y Pro; Ala y Gly; Ala y Ser; Ala y Lys; Ser y Thr; Lys y Arg; Val y Leu; Leu e Ile; Ile y Val; Phe y Tyr. (Id.) Se han construido varias matrices para ayudar en la selección de sustituciones de aminoácidos, como la matriz de puntuación PAM250, la matriz Dayhoff, la matriz Grantham, la matriz McLachlan, la matriz Doolittle, la matriz Henikoff, la matriz Miyata, la matriz Fitch, la matriz Jones, la matriz Rao, la matriz Levin y la matriz Risler (*Idem*).

[0123] Al determinar las sustituciones de aminoácidos, también se puede considerar la existencia de enlaces intermoleculares o intramoleculares, como la formación de enlaces iónicos (puentes salinos) entre residuos cargados

positivamente (por ejemplo, His, Arg, Lys) y residuos cargados negativamente (por ejemplo, Asp, Glu) o enlaces disulfuro entre residuos de cisteína cercanos.

[0124] Los métodos de sustitución de cualquier aminoácido por cualquier otro aminoácido en una secuencia de proteína codificada son bien conocidos y una cuestión de experimentación rutinaria para el artesano experto, por ejemplo mediante la técnica de mutagénesis dirigida al sitio o por síntesis y ensamblaje de oligonucleótidos que codifican una sustitución de aminoácido y empalme en una construcción de vector de expresión.

Expresión en Fago

[0125] Ciertas formas de realización de las composiciones y/o métodos reivindicados pueden referirse a péptidos de unión y/o miméticos peptídicos de diversas moléculas diana, células o tejidos. Los péptidos de unión pueden identificarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a la técnica de expresión en fago. Varios métodos de expresión en fago y técnicas para producir diversas poblaciones de péptidos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, Patente de EE. UU. N.º 5,223,409; 5,622,699 y 6,068,829 divulgan métodos para preparar una biblioteca de fagos. La técnica de expresión en fago consiste en manipular genéticamente los bacteriófagos para que puedan expresar pequeños péptidos en su superficie (Smith y Scott, 1985, Science 228:1315-1317; Smith y Scott, 1993, Meth. Enzymol. 21:228-257). Además de péptidos, en la superficie de las partículas fágicas también pueden aparecer dominios proteicos de mayor tamaño, como anticuerpos de cadena simple (Arap et al., 1998, Science 279:377-380).

[0126] Las secuencias de aminoácidos diana selectivas para un determinado órgano, tejido, tipo de célula o molécula diana pueden aislarse mediante *panning* (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 diana 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 o molécula diana y luego amplificarse cultivándolos en bacterias huésped.

[0127] En ciertas formas de realización, el fago puede propagarse en bacterias huésped entre rondas de *panning*. En lugar de ser lisadas por los fagos, las bacterias pueden segregar múltiples copias de fagos con un inserto concreto. Si se desea, el fago amplificado puede exponerse de nuevo a los órganos, tejidos, tipos celulares o molécula diana y recogerse para rondas adicionales de *panning*. Se pueden realizar múltiples rondas de *panning* hasta obtener una población de aglutinantes 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. El péptido diana identificado puede entonces producirse como péptido sintético mediante técnicas estándar de química de proteínas (Arap et al., 1998, Smith et al., 1985).

[0128] En algunas formas de realización, puede utilizarse un protocolo de sustracción para reducir aún más la unión de fagos de fondo. El objetivo de la sustracción es eliminar de la biblioteca los fagos que se unen a dianas distintas de la diana de interés. En otras realizaciones, 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. Tras la sustracción, la biblioteca puede analizarse frente a la molécula, célula, tejido u órgano de interés. Se conocen otros métodos de protocolos de sustracción que pueden utilizarse en la práctica de los métodos reivindicados, por ejemplo, los divulgados en las patentes estadounidenses Nos. 5,840,841, 5,705,610, 5,670,312 y 5,492,807;

Protocolos de Conjugación

[0129] El protocolo de conjugación preferido se basa en una reacción tiol-maleimida, tiol-vinilsulfona, tiol-bromoacetamida o tiol-iodoacetamida que son fáciles a pH neutro o ácido. Esto evita la necesidad de condiciones de pH más altas para las conjugaciones como, por ejemplo, sería necesario cuando se utilizan ésteres activos. En la sección Ejemplos se describen más detalles de protocolos de conjugación ejemplares.

Tratamiento Terapéutico

[0130] La invención se refiere al uso de un conjugado terapéutico tal como se describe en el presente documento en un método de tratamiento de un sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado terapéutico tal como se describe en el presente documento a un sujeto. Las enfermedades que pueden tratarse con los conjugados terapéuticos descritos en el presente documento incluyen, entre otras, neoplasias malignas de células B (por ejemplo, linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica utilizando, por ejemplo, LL2 MAb; véase Patente de EEUU. N.º 6.183.744), adenocarcinomas de epitelios endodermiales del aparato digestivo, cánceres como el de mama y el de pulmón no microcítico, y otros carcinomas, sarcomas, tumores gliales, leucemias mieloides, etc. En particular, se utilizan 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, pulmonar, de mama, de próstata, ovárico, testicular, cerebral o linfático, un sarcoma o un melanoma. Dichas terapias pueden administrarse una o varias veces, dependiendo del estado de la enfermedad y de la tolerabilidad del conjugado, y también pueden utilizarse de forma óptima en combinación con otras modalidades terapéuticas, como la cirugía, la radiación externa, la

radioinmunoterapia, la inmunoterapia, la quimioterapia, la terapia antisentido, la terapia de ARN de interferencia, la 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.

- 5 **[0131]** Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (es decir, vertebrados e invertebrados) incluyendo, pero no limitado a mamíferos, incluyendo humanos. No se pretende que el término se limite a una edad o sexo determinados. Por lo tanto, los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean hombres o mujeres, están incluidos en el término.
- 10 **[0132]** En una forma de realización preferida, los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb Mu-9 pueden usarse para tratar cánceres colorrectales, así como pancreáticos y ováricos, como se divulga en Patente de EEUU. Patente de EEUU. N.º. 6,962,702 y 7,387,772; Además, los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb PAM4 pueden utilizarse para tratar el cáncer de páncreas, como se divulga en Patente de EEUU. N.º. 7,238,786 y 7,282,567;
- 15 **[0133]** En otra forma de realización preferida, los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb RS7 (que se une al antígeno de la glicoproteína epitelial-1 [EGP-1]) pueden utilizarse para tratar carcinomas tales como carcinomas de pulmón, estómago, vejiga urinaria, mama, ovario, útero y próstata, como se divulga en Patente de EEUU. Patente n.º 7.238.785.
- 20 **[0134]** En otra forma de realización preferida, los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb anti-AFP 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 Patente de EEUU. Patente n.º 7.300.655.
- 25 **[0135]** En otra forma de realización preferida, 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, preferentemente cánceres cerebrales como glioblastomas.
- 30 **[0136]** En una forma de realización preferida, los anticuerpos que se usan en el tratamiento de enfermedades humanas son versiones humanas o humanizadas (CDR-injertadas) de anticuerpos; aunque pueden usarse versiones murinas y quiméricas de anticuerpos. Se prefieren las moléculas IgG de la misma especie como agentes de administración para minimizar las respuestas inmunitarias. Esto es especialmente importante cuando se considera la posibilidad de repetir el tratamiento. En el caso de los seres humanos, es menos probable que un anticuerpo IgG humano o humanizado genere una respuesta inmunitaria anti-IgG en los pacientes. Los anticuerpos como hLL1 y hLL2 se internalizan rápidamente tras unirse al antígeno internalizante 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 utilizarse para efectuar una terapia selectiva.
- 35 **[0137]** En otra forma de realización preferida, los conjugados terapéuticos pueden usarse contra patógenos, ya que los anticuerpos contra patógenos son conocidos. 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 causadas 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 EE. UU. n.º 3.927.193 y Patente de EE. UU. de Goldenberg N.º. 4.331.647, 4.348.376, 4.361.544, 4.468.457, 4.444.744, 4.818.709 y 4.624.846, y en Reichert y Dewitz, antes citados. En una realización preferida, los patógenos se seleccionan del grupo que consiste en el virus VIH, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemophilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, virus de la rabia, virus de la gripe, citomegalovirus, virus del herpes simple I, virus del herpes simple II, virus parvo-like del suero 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 poliomieltitis, virus simio 40, virus del tumor mamario de ratón, virus del dengue, virus de la rubéola, virus del Nilo Occidental, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rhodesiensei*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Babesia bovis*, *Elmeria tenella*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania tropica*, *Trichinella spiralis*, *Theileria parva*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti*, *Mycoplasma arthritidis*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. salivarium* y *M. pneumoniae*, según se describe en el documento Patente de EEUU N.º 6.440.416.
- 40 **[0138]** En una forma de realización más preferida, los conjugados de fármacos de la presente invención que comprenden anticuerpos anti-gp120 y otros anticuerpos anti-VIH de este tipo pueden utilizarse como terapéuticos para el VIH en pacientes con SIDA; y los conjugados de fármacos de anticuerpos contra *Mycobacterium tuberculosis* son adecuados como terapéuticos para la tuberculosis refractaria a fármacos. Se han examinado las propiedades antivirales de las proteínas de fusión de MAb anti-gp120 (MAb anti-VIH) y una toxina, como la exotoxina de *Pseudomonas* (Van Oigen et
- 45 *50*
55
60

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 tales efectos secundarios tóxicos de las toxinas proteicas, y por lo tanto se utilizan ventajosamente en el tratamiento de la infección por VIH en pacientes con SIDA. Estos conjugados farmacológicos pueden administrarse solos o en combinación con otros antibióticos o agentes terapéuticos que sean eficaces en dichos pacientes cuando se administran solos. Entre los anticuerpos candidatos contra el VIH se incluye el anticuerpo antienvolvente descrito por Johansson et al. (AIDS. 2006 Oct 3;20(15): 1911-5), así como los anticuerpos contra el VIH descritos y vendidos por Polymun (Viena, Austria), también descritos en Patente de EEUU. N.º 5.831.034, Patente de EEUU. N.º 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 diana preferido para el VIH son varias combinaciones de estos anticuerpos con el fin de superar la resistencia.

[0139] En otra forma de realización preferida, las enfermedades que pueden tratarse usando los conjugados terapéuticos de las formas de realización preferidas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a enfermedades de desregulación inmunitaria y enfermedades autoinmunitarias relacionadas, incluyendo enfermedades autoinmunitarias de Clase III tales como trombocitopenias inmunomediadas, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, síndrome de Sjögren de Sjögren, esclerosis múltiple, corea de Sydenham, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide ampolloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis postestreptocócica, eritema nodoso, arteritis de Takayasu, púrpura de Addison de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirototoxicosis, dermatosis tiroidea, etc. tiroiditis de Hashimoto, tirototoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, artritis reumatoide, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, membranitis, etc. granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis/polimialgia de células gigantes, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva y alveolitis fibrosante, así como diabetes juvenil, según se divulga en Patente de EEUU. Solicitud provisional N.º. de Serie 60/360.259, depositada el 1 de marzo de 2002 (ya caducada). Los anticuerpos típicos útiles en estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, los reactivos con antígenos HLA-DR, antígenos de células B y células plasmáticas (por ejemplo, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD74, CD80, CD126, CD138, B7, MUC1, Ia, HM1.24, y HLA-DR), IL-6, IL-17. Dado que muchas de estas enfermedades autoinmunes se ven afectadas por autoanticuerpos producidos por poblaciones aberrantes de células B, el agotamiento de estas células B mediante conjugados terapéuticos que incluyan dichos conjugados anticuerpo-agente terapéutico descritos en el presente documento es un método preferido de terapia de enfermedades autoinmunes, especialmente cuando los anticuerpos de células B se combinan, en determinadas circunstancias, con anticuerpos HLA-DR y/o anticuerpos de células T (incluidos los que se dirigen a la 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 lugar a una terapéutica más eficaz 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 el TNF, anticuerpos no conjugados contra células B o T, y similares.

[0140] En una forma de realización preferida, puede lograrse una incorporación más eficaz en células y patógenos utilizando anticuerpos multivalentes, multiespecíficos o multivalentes, mono-específicos. Ejemplos de tales anticuerpos bivalentes y biespecíficos se encuentran en Patente de EEUU. N.º. 7.387.772; 7.300.655; 7.238.785; y 7.282.567. Estos anticuerpos multivalentes o multiespecíficos son particularmente preferibles en la marcación de cánceres y organismos infecciosos (patógenos), que expresan múltiples antígenos diana e incluso múltiples epítopos del mismo antígeno diana, pero que a menudo eluden el tratamiento con anticuerpos y la unión suficiente para la inmunoterapia debido a la insuficiente expresión o disponibilidad de un único antígeno diana en la célula o patógeno. Al marcar múltiples antígenos o epítopos, dichos anticuerpos muestran un mayor tiempo de unión y residencia en la diana, proporcionando así una mayor saturación con el fármaco al que se dirigen en esta invención.

[0141] En otra forma de realización preferida, un agente terapéutico utilizado en combinación con el conjugado de camptotecina de esta invención puede comprender uno o más isótopos. Los isótopos radiactivos útiles para el tratamiento de tejidos enfermos incluyen, entre otros, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹¹At, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³²P, ³³P, ⁴⁷Sc, ¹¹¹Ag, ⁶⁷Ga, ¹⁴²Pr, ¹⁵³Sm, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁶Ho, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ²¹²Pb, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ⁷⁷As, ⁸⁹Sr, ⁹⁹Mo, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹⁴³Pr, ¹⁴⁹Pm, ¹⁶⁹Er, ¹⁹⁴Ir, ¹⁹⁸Au y ²¹¹Pb. El radionucleido terapéutico tiene preferentemente una energía de desintegración en el rango de 20 a 6.000 keV, preferentemente en los rangos de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2.500 keV para un emisor beta, y 4.000-6.000 keV para un emisor alfa. Las energías máximas de desintegración de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente de 20-5.000 keV, más preferiblemente de 100-4.000 keV, y más preferiblemente de 500-2.500 keV. También se prefieren los radionucleidos que decaen sustancialmente con partículas emisoras Auger. Por ejemplo, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m e Ir-192. Las energías de desintegración de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente <1.000 keV, más preferiblemente <100 keV, y más preferiblemente <70 keV. También se prefieren los radionucleidos que decaen sustancialmente con generación de partículas alfa. Tales radionucleidos incluyen, pero no se limitan a: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-

219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 y Fm-255. Las energías de desintegración de los radionucleidos emisores de partículas alfa útiles son preferiblemente de 2.000-10.000 keV, más preferiblemente de 3.000-8.000 keV, y más preferiblemente de 4.000-7.000 keV. Otros posibles radioisótopos de uso son ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁵Br, ¹⁹⁸Au, ²²⁴Ac, ¹²⁶I, ¹³³I, ⁷⁷Br, ^{113m}In, ⁹⁵Ru, ⁹⁷Ru, ¹⁰³Ru, ¹⁰⁵Ru, ¹⁰⁷Hg, ²⁰³Hg, ^{121m}Te, ^{122m}Te, ^{125m}Te, ¹⁶⁵Tm, ¹⁶⁷Tm, ¹⁶⁸Tm, ¹⁹⁷Pt, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁵Rh, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Ho, ¹⁹⁹Au, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵¹Cr, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ²⁰¹Tl, ²²⁵Ac, ⁷⁶Br, ¹⁶⁹Yb, y similares.

[0142] Los radionucleidos y otros metales pueden administrarse, por ejemplo, utilizando grupos quelantes unidos a un anticuerpo o conjugado. Los quelatos macrocíclicos como NOTA, DOTA y TETA se utilizan con diversos metales y radiometales, en particular 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 utilizarse otros quelatos de tipo anillo, como los poliéteres macrocíclicos para la complejación del ²²³Ra.

[0143] Los agentes terapéuticos de uso en combinación con los conjugados de camptotecina aquí descritos también incluyen, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos como alcaloides de vinca, antraciclinas, epidilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de Cox-2, antimetabólicos, 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, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en GOODMAN Y GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985), así como ediciones revisadas de estas publicaciones. Otros agentes quimioterapéuticos adecuados, como los fármacos experimentales, son conocidos por los expertos en la técnica.

[0144] Los fármacos ejemplares de uso incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, apilidina, azaribina, anastrozol, antraciclinas, bendamustina, bleomicina, bortezomib, briostatina-1, busulfán, calicheamicina, camptotecina, carboplatino, 10-hidroxicamptotecina, carmustina, celebrex, clorambucil, cisplatino (CDDP), inhibidores de Cox-2, irinotecán (CPT-11), SN-38, carboplatino, cladribina, camptotecinas, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, docetaxel, dactinomina, daunorrubicina, doxorubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina (2P-DOX), ciano-morfolino doxorubicina, glucurónido de doxorubicina, glucurónido de epirubicina, estramustina, epidilotoxina, agentes de unión a receptores de estrógenos, etopósido (VP16), glucurónido de etopósido, fosfato de etopósido, floxuridina (FUdR), 3',5'-O-dioleoyl-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, gemcitabina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, L-asparaginasa, lenolidamida, leucovorina, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, navelbina, nitrosourea, plicomicina, procarbazona, paclitaxel, pentostatina, PSI-341, raloxifeno, semustina, estreptozocina, tamoxifeno, taxol, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecán, mostaza uracilo, vinorelbina, vinblastina, vincristina y alcaloides de la vinca. Dichos agentes pueden formar parte de los conjugados aquí descritos o, alternativamente, pueden administrarse en combinación con los conjugados descritos, ya sea antes, simultáneamente o después del conjugado. Alternativamente, uno o más anticuerpos terapéuticos desnudos conocidos en la técnica pueden utilizarse en combinación con los conjugados descritos. En la sección anterior se describen anticuerpos terapéuticos desnudos ejemplares.

[0145] Los agentes terapéuticos que pueden usarse conjuntamente con los conjugados de camptotecina también pueden comprender toxinas conjugadas con moléculas diana. Las toxinas que pueden utilizarse a este respecto incluyen la ricina, la abrina, la ribonucleasa (RNasa), la DNasa I, la enterotoxina estafilocócica A, la proteína antiviral de fitolaca americana, la gelonina, la toxina differina, la exotoxina de Pseudomonas y la endotoxina de Pseudomonas. (See, e.g., Pastan. et al., Cell (1986), 47:641, and Sharkey and Goldenberg, CA Cancer J Clin. 2006 Jul-Aug;56(4):226-43.) Las toxinas adicionales adecuadas para su uso en el presente documento son conocidas por los expertos en la materia y se describen en Patente de EEUU. N.º 6,077,499.

[0146] Otra clase de agente terapéutico puede comprender uno o más inmunomoduladores. Los inmunomoduladores de uso pueden seleccionarse entre una citocina, un factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF), un interferón (IFN), eritropoyetina, trombopoyetina y una combinación de los mismos. Son específicamente útiles las linfoxinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF), los factores hematopoyéticos, como la interleucina (IL), el factor estimulante de colonias, como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), el interferón, como los interferones- α , - β o - γ , y el factor de crecimiento de células madre, como el denominado "factor S1". Entre las citocinas se incluyen hormonas de crecimiento como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana N-metionil y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteicas como la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor de necrosis tumoral- α y - β ; sustancia inhibidora de la mulleriana; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina

(EPO); factores osteoinductores; interferones como interferón- α , - β y - γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs) como el macrophage-CSF (M-CSF); interleucinas (ILs) como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, kit-ligando o FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, factor de necrosis tumoral y LT. Tal como se utiliza en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

[0147] Las quimiocinas de uso incluyen RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-Beta e IP-10.

10 **Formulación y Administración**

[0148] Las vías de administración adecuadas de los conjugados incluyen, sin limitación, la administración oral, parenteral, rectal, transmucosa, intestinal, intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intravítrea, intraperitoneal, intranasal o intraocular. Las vías de administración preferidas son las parenterales. Alternativamente, se puede administrar el compuesto de forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección del compuesto directamente en un tumor sólido.

[0149] Los inmunoconjugados pueden formularse según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en las que el inmunoconjugado se combina en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La solución salina estéril tamponada con fosfato es un ejemplo de excipiente farmacéuticamente adecuado. Otros excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5ª edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª edición (Mack Publishing Company 1990), y sus ediciones revisadas.

[0150] El inmunoconjugado puede formularse para administración intravenosa mediante, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Preferiblemente, el conjugado se infunde durante un periodo inferior a unas 4 horas, y más preferiblemente, durante un periodo inferior a unas 3 horas. Por ejemplo, los primeros 25-50 mg podrían infundirse en 30 minutos, preferiblemente incluso en 15 minutos, y el resto en las 2-3 horas siguientes. Las formulaciones inyectables pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

[0151] Pueden emplearse métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción del conjugado terapéutico. Las preparaciones de liberación controlada pueden prepararse mediante el uso de polímeros para complejar o adsorber el inmunoconjugado. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli(etileno-co-acetato de vinilo) y matrices de un copolímero polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebáico. Sherwood et al., Bio/Technology 10: 1446 (1992). La velocidad de liberación de un inmunoconjugado a partir de una matriz de este tipo depende del peso molecular del inmunoconjugado, de la cantidad de inmunoconjugado dentro de la matriz y del tamaño de las partículas dispersas. Saltzman et al., Biophys. J. 55: 163 (1989); Sherwood *et al.*, *supra*. Otras formas farmacéuticas sólidas se describen en Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5ª Edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª Edición (Mack Publishing Company 1990), y sus ediciones revisadas.

[0152] Generalmente, la dosis de un inmunoconjugado administrado para humanos variará dependiendo de factores como la edad, peso, altura, sexo, condición médica general e historial médico previo del paciente. Puede ser deseable proporcionar al receptor una dosis de inmunoconjugado que esté en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a 25 mg/kg como infusión intravenosa única, aunque también puede administrarse una dosis menor o mayor según dicten las circunstancias. Una dosis de 1-20 mg/kg para un paciente de 70 kg, por ejemplo, es de 70-1.400 mg, o 41-824 mg/m² para un paciente de 1,7 m. La dosis puede repetirse según sea necesario, por ejemplo, una vez a la semana durante 4-10 semanas, una vez a la semana durante 8 semanas o una vez a la semana durante 4 semanas. También puede administrarse con menos frecuencia, por ejemplo cada dos semanas durante varios meses, o mensual o trimestralmente durante muchos meses, según sea necesario en una terapia de mantenimiento.

[0153] Alternativamente, un inmunoconjugado puede administrarse como una dosis cada 2 o 3 semanas, repetida para un total de al menos 3 dosis. O bien, dos veces por semana durante 4-6 semanas. Si la dosis se reduce a aproximadamente 200-300 mg/m² (340 mg por dosis para un paciente de 1,7 m, o 4,9 mg/kg para un paciente de 70 kg), puede administrarse una o incluso dos veces por semana durante 4 a 10 semanas. Alternativamente, se puede disminuir la pauta de dosificación, a saber, cada 2 ó 3 semanas durante 2-3 meses. Sin embargo, se ha determinado que incluso dosis más altas, como 20 mg/kg una vez por semana o una vez cada 2-3 semanas, pueden administrarse mediante infusión i.v. lenta, para ciclos de dosificación repetidos. La pauta de dosificación puede repetirse opcionalmente a otros intervalos y la dosis puede administrarse por diversas vías parenterales, con el ajuste adecuado de la dosis y la pauta.

[0154] En formas de realización preferidas, los inmunoconjugados se utilizan para la terapia del cáncer. Algunos ejemplos

de cánceres son, entre otros, carcinoma, linfoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma y leucemia, mieloma o neoplasias linfoides. Ejemplos más particulares de tales cánceres se indican a continuación e incluyen: cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer epitelial de células escamosas), sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, astrocitomas, cáncer de pulmón incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluido el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, carcinoma hepatocelular, tumores neuroendocrinos, cáncer medular de tiroides, carcinoma diferenciado de tiroides, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello. El término "cáncer" incluye células o tumores malignos primarios (por ejemplo, aquellos cuyas células no han migrado a sitios del cuerpo del sujeto distintos del sitio de la neoplasia o tumor original) y células o tumores malignos secundarios (por ejemplo, los que surgen de la metástasis, la migración de células malignas o células tumorales a sitios secundarios distintos del sitio del tumor original).

[0155] Otros ejemplos de cánceres o neoplasias malignas incluyen, pero no se limitan a: Leucemia linfoblástica infantil aguda, Leucemia linfoblástica aguda, Leucemia linfocítica aguda, Leucemia mielóide aguda, Carcinoma corticosuprarrenal, Cáncer hepatocelular (primario) del adulto, Cáncer de hígado (primario) del adulto, Leucemia linfocítica aguda del adulto, Leucemia mielóide aguda del adulto, Linfoma de Hodgkin del adulto, Leucemia linfocítica del adulto, Leucemia no Hodgkin del adulto, Cáncer primario de hígado en adultos, Sarcoma de tejidos blandos en adultos, Linfoma relacionado con el SIDA, Neoplasias malignas relacionadas con el SIDA, Cáncer anal, Astrocitoma, Cáncer de vías biliares, Cáncer de vejiga, Cáncer óseo, Glioma de tronco cerebral, Tumores cerebrales, Cáncer de mama, Cáncer de pelvis renal y uréter, Linfoma (primario) del sistema nervioso central, Linfoma del sistema nervioso central, Astrocitoma cerebeloso, Astrocitoma cerebral, Cáncer de cuello uterino, Cáncer hepatocelular infantil (primario), Cáncer de hígado infantil (primario), Leucemia linfoblástica aguda infantil, Leucemia mielóide aguda infantil, Glioma de tronco encefálico infantil, Astrocitoma cerebeloso infantil, Astrocitoma cerebral infantil, Tumores extracraneales de células germinales infantiles, Enfermedad de Hodgkin infantil, Linfoma de Hodgkin infantil, glioma hipotalámico y de la vía visual infantil, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no Hodgkins, tumores neuroectodérmicos primitivos pineales y supratentoriales infantiles, cáncer primario de hígado infantil, rhabdomyosarcoma infantil, sarcoma de partes blandas infantil, glioma hipotalámico y de la vía visual infantil, Leucemia linfocítica crónica, Leucemia mielógena crónica, Cáncer de colon, Linfoma cutáneo de células T, Carcinoma endocrino de células de los islotes pancreáticos, Cáncer de endometrio, Ependimoma, Cáncer epitelial, Cáncer de esófago, Sarcoma de Ewing y tumores afines, cáncer de páncreas exocrino, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer ocular, cáncer de mama femenino, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer de próstata, cáncer de próstata, cáncer de próstata, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer gástrico, Tumor carcinoide gastrointestinal, Tumores gastrointestinales, Tumores de células germinales, Tumor trofoblástico gestacional, Leucemia de células pilosas, Cáncer de cabeza y cuello, Cáncer hepatocelular, Linfoma de Hodgkin, Hiper gammaglobulinemia, Cáncer hipofaríngeo, Cánceres intestinales, Melanoma intraocular, Carcinoma de células de los islotes, Cáncer pancreático de células de los islotes, Sarcoma de Kaposi, Cáncer de riñón, Cáncer de laringe, Cáncer de labio y cavidad oral, Cáncer de hígado, Cáncer de pulmón, Trastornos linfoproliferativos, Macroglobulinemia, Cáncer de mama masculino, Mesotelioma maligno, Timoma maligno, Meduloblastoma, Melanoma, Mesotelioma, Cáncer escamoso primario oculto metastásico de cuello, Cáncer escamoso primario metastásico de cuello, Cáncer escamoso metastásico de cuello, Mieloma múltiple, Mieloma múltiple/Neoplasma de células plasmáticas, Síndrome mielodisplásico, Leucemia mielógena, Leucemia mielóide, Trastornos mieloproliferativos, Cáncer de cavidad nasal y senos paranasales, Cáncer nasofaríngeo, Neuroblastoma, Linfoma no Hodgkin, Linfoma no melanocítico, Cáncer de piel no melanoma, Cáncer de pulmón no microcítico, Cáncer escamoso metastásico primario oculto de cuello, Cáncer orofaríngeo, Sarcoma fibroso osteo/maligno, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno óseo, Cáncer epitelial de ovario, Tumor de células germinales de ovario, Tumor ovárico de bajo potencial maligno, Cáncer de páncreas, Paraproteinemias, Policitemia vera, Cáncer de paratiroides, Cáncer de pene, Feocromocitoma, Tumor hipofisario, Linfoma primario del sistema nervioso central, Cáncer primario de hígado, Cáncer de próstata, Cáncer de recto, Cáncer de células renales, Cáncer de pelvis renal y de uréter, Retinoblastoma, Rhabdomyosarcoma, Cáncer de Glándulas Salivares, Sarcomas Sarcoidosis, Síndrome de Sezary, Cáncer de Piel, Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas, Cáncer de Intestino Delgado, Sarcoma de Tejidos Blandos, Cáncer Escamoso de Cuello, Cáncer de Estómago, Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Supratentoriales y Pineales, Linfoma de Células T, Cáncer Testicular, Timoma, Cáncer de tiroides, Cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter, Cáncer transicional de pelvis renal y uréter, Tumores trofoblásticos, Cáncer de células de pelvis renal y uréter, Cáncer de uretra, Cáncer de útero, Sarcoma uterino, Cáncer de vagina, Glioma de la vía visual y glioma hipotalámico, Cáncer de vulva, Macroglobulinemia de Waldenstrom, Tumor de Wilms, y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de la neoplasia, localizada en un sistema de órganos de la lista anterior.

[0156] Los métodos y composiciones descritos y reivindicados en el presente documento pueden utilizarse para tratar afecciones malignas o premalignas y para prevenir la progresión a un estado neoplásico o maligno, incluidos, entre otros, los trastornos descritos anteriormente. Tales usos están indicados en condiciones conocidas o sospechosas de preceder a la progresión a neoplasia o cáncer, en particular, cuando se ha producido un crecimiento celular no neoplásico consistente en hiperplasia, metaplasia o, más particularmente, displasia (para una revisión de tales condiciones de crecimiento anormal, véase Robbins y Angell, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79 (1976)).

[0157] La displasia es con frecuencia un precursor del cáncer y se encuentra principalmente en los epitelios. Es la forma más desordenada de crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida de la uniformidad celular individual y de la orientación arquitectónica de las células. La displasia se produce característicamente cuando existe irritación o inflamación crónica. Los trastornos displásicos que pueden tratarse incluyen, entre otros, la displasia ectodérmica anhidrótica, la displasia anterofacial, la displasia torácica asfixiante, la displasia atriodigital, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia cervical, displasia condroectodérmica, displasia cleidocraneal, displasia ectodérmica congénita, displasia craneoidea, displasia craniocarpotarsal, displasia craniometafisaria, displasia dentinaria, displasia diafisaria, displasia ectodérmica, displasia del esmalte, displasia encefalo-oftálmica, displasia epifisaria hemimelia, displasia epifisaria múltiple, displasia epifisaria punctata, displasia epitelial, displasia facioidigitogenital, displasia fibrosa familiar de los maxilares, displasia familiar de pliegues blancos, displasia fibromuscular, displasia fibrosa ósea, displasia ósea florida, displasia renal-retiniana hereditaria, displasia ectodérmica hidrótica, displasia ectodérmica hipohidrótica, displasia tímica linfopénica, displasia mamaria, displasia mandibulofacial, displasia metafisaria, displasia de Mondini, displasia fibrosa monostótica, displasia mucoepitelial, displasia epifisaria múltiple, displasia oculoauriculovertebral, displasia oculodentodigital, displasia oculovertébral, displasia odontogénica, displasia oftalmomandibulomélica, displasia cementaria periapical, displasia fibrosa polioestótica, displasia espondiloepifisaria pseudocondroplásica, displasia retiniana, displasia septoóptica, displasia espondiloepifisaria y displasia ventriculorrádial.

[0158] Trastornos pre-neoplásicos adicionales que pueden ser tratados incluyen, pero no se limitan a, trastornos disproliferativos benignos (por ejemplo, tumores benignos, condiciones fibroquísticas, hipertrofia tisular, pólipos o adenomas intestinales y displasia esofágica), leucoplasia, queratosis, enfermedad de Bowen, Piel de Farmer, queilitis solar y queratosis solar.

[0159] En formas de realización preferidas, el conjugado se utiliza para inhibir el crecimiento, la progresión y/o la metástasis de cánceres, en particular los enumerados anteriormente.

[0160] Enfermedades, trastornos y/o condiciones hiperproliferativas adicionales incluyen, pero no se limitan a, progresión y/o metástasis de neoplasias malignas y trastornos relacionados tales como leucemia (incluyendo leucemias agudas (p.ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluyendo mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (p. ej., leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom's macroglobulinemia, heavy chain disease, and solid tumors including, but not limited to, sarcomas and carcinomas such as fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphoendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabiomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma vesical, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, emangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Kits

[0161] Los kits que contienen componentes adecuados para tratar el tejido enfermo de un paciente pueden contener al menos un anticuerpo conjugado u otra fracción de marcación como se describe en el presente documento. Si la composición que contiene los componentes para la administración no está formulada para ser administrada a través del canal alimentario, como por vía oral, puede incluirse un dispositivo capaz de administrar los componentes del kit a través de alguna otra vía. Un tipo de dispositivo, para aplicaciones como la administración parenteral, es una jeringa que se utiliza para inyectar la composición en el cuerpo de un sujeto. También pueden utilizarse dispositivos de inhalación.

[0162] Los componentes del kit pueden envasarse juntos o separados en dos o más recipientes. En algunas realizaciones, los recipientes pueden ser viales que contienen formulaciones estériles y liofilizadas de una composición que son adecuadas para la reconstitución. Un kit también puede contener uno o más tampones adecuados para la reconstitución y/o dilución de otros reactivos. Otros recipientes que pueden utilizarse son, entre otros, bolsas, bandejas, cajas, tubos o similares. Los componentes del kit pueden envasarse y mantenerse estériles dentro de los contenedores. Otro componente que puede incluirse son las instrucciones de uso del kit.

EJEMPLOS

[0163] Los siguientes ejemplos ilustran diversas formas de realización.

General

[0164] Las abreviaturas utilizadas a continuación son: DCC, diciclohexilcarbodiimida; NHS, N-hidroxisuccinimida; DMAP, 4-dimetilaminopiridina; EEDQ, 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina; MMT, monometoxitritilo; PABOH, alcohol *p*-

aminobencílico; PEG, polietilenglicol; SMCC, 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo; TBAF, fluoruro de tetrabutilamonio; TBDMS, cloruro de *tert*-butildimetilsililo.

5 [0165] Los cloroformatos de compuestos hidroxilados de los ejemplos siguientes se prepararon usando trifosgeno y DMAP según el procedimiento descrito en Moon et al. (J. Medicinal Chem. 51:6916-6926, 2008). El trabajo extractivo se refiere a la extracción con cloroformo, diclorometano o acetato de etilo, y al lavado opcionalmente con bicarbonato saturado, agua y con cloruro sódico saturado. La cromatografía flash se realizó con gel de sílice de malla 230-400 y gradiente de metanol-diclorometano, utilizando hasta un 15% v/v de metanol-diclorometano, a menos que se indique lo contrario. La HPLC de fase inversa se realizó por el método A utilizando una columna de HPLC C18 de 7,8 × 300 mm, provista de un filtro precolumna, y utilizando un gradiente de disolvente del 100% del disolvente A al 100% del disolvente B en 10 minutos a un caudal de 3 mL por minuto y manteniéndolo al 100% del disolvente B a un caudal de 45 mL por minuto durante 5 o 10 minutos; o por el método B utilizando una columna Xbridge C18 de 4,6×30 mm, 2,5 μm, provista de un filtro precolumna, y utilizando el gradiente de disolvente de 100% de disolvente A a 100% de disolvente B a un caudal de 1,5 mL por minuto durante 4 minutos y 100% de disolvente B a un caudal de 2 mL por minuto durante 1 minuto. El disolvente A era acetato de amonio acuoso al 0,3%, pH 4,46 mientras que el disolvente B era acetonitrilo-acetato de amonio acuoso 9:1 (0,3%), pH 4,46. La HPLC se controló mediante un detector de absorbancia en línea doble ajustado a 360 nm y 254 nm.

Ejemplo de Referencia 1: Preparación de CL6-SN-38

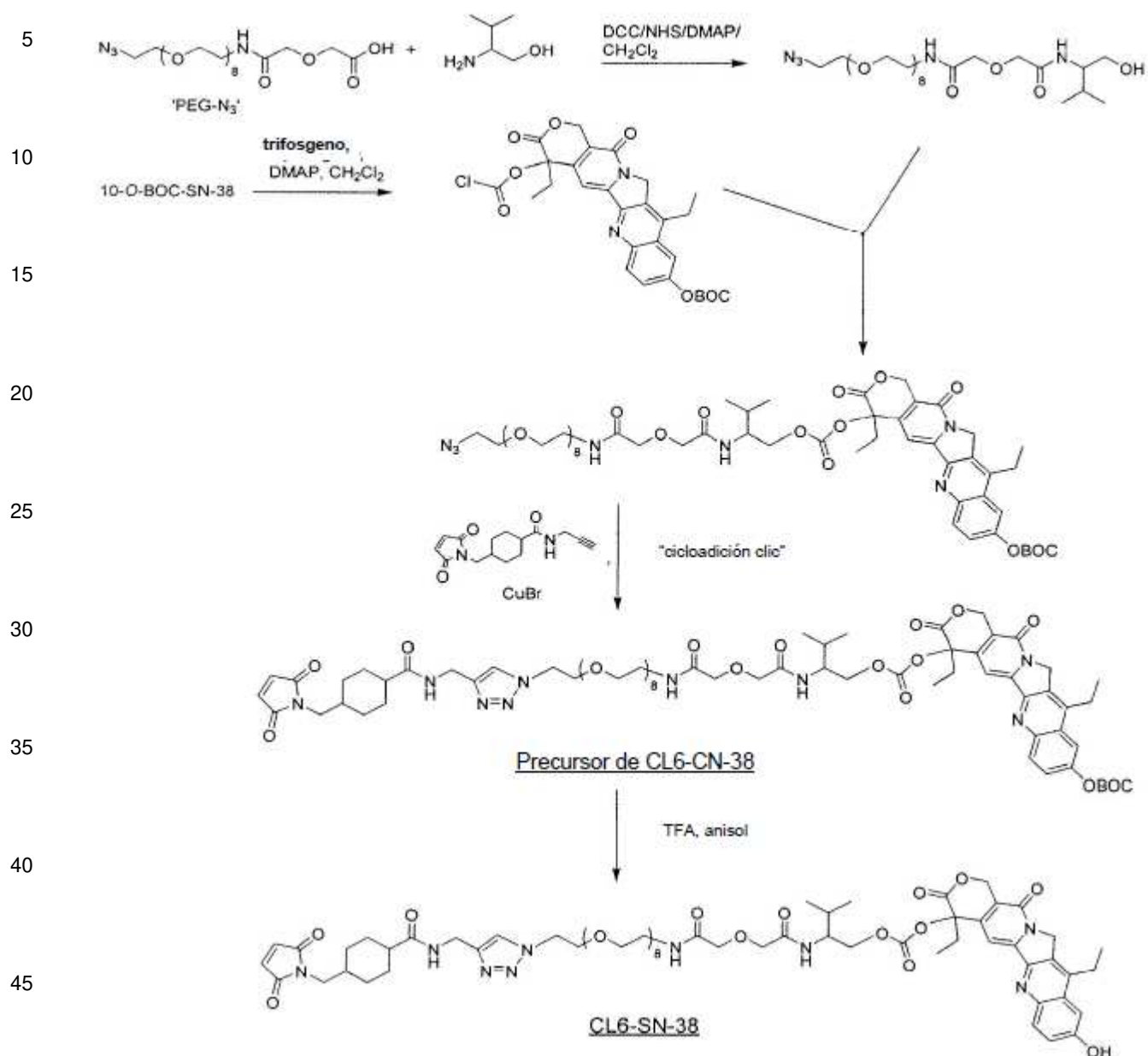
20 [0166] CL6-SN-38 se representa en el Esquema-1. El O-(2-azidoetil)-O'-(*N*-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N3'; 227 mg) disponible comercialmente se activó con DCC (100 mg), NHS (56 mg) y una cantidad catalítica de DMAP en 10 mL de diclorometano durante 10 min. A esta mezcla se añadió L-valinol (46,3 mg), y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La filtración, seguida de la eliminación del disolvente y la cromatografía flash, produjo 214 mg de material aceitoso transparente. Este intermedio (160 mg) se hizo reaccionar con 10-O-BOC-SN-38-20-O-cloroformato, este último generado a partir de 10-O-BOC-SN-38(123 mg) utilizando trifosgeno y DMAP. La reacción de acoplamiento se realizó en 4 mL de diclorometano durante 10 min, y la mezcla de reacción se purificó por cromatografía flash para obtener 130 mg (45% de rendimiento) de producto como material espumoso. HPLC: t_R 11,80 min; espectro de masas electrospray: M+Na: m/z 1181.

30 [0167] El reactivo acetilénico que contiene maleimida, a saber 4-(*N*-maleimidometil)-*N*-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida, necesario para la cicloadición clic, se preparó haciendo reaccionar 0,107 g de SMCC y 0,021 mL de propargilamina (0,018 g; 1,01 equiv.) en diclorometano utilizando 1,1 equiv. de diisopropiletilamina. Tras 1 h, se eliminó el disolvente y el producto se purificó por cromatografía flash para obtener 83 mg del producto (polvo incoloro). El espectro de masas por electrospray mostró picos a m/e 275 (M+H) y un pico base a m/e 192 en el modo de iones positivos, coherente con la estructura calculada para C₁₅H₁₈N₂O₃: 275.1390 (M+H), encontrada: 275,1394 (masa exacta).

35 [0168] El intermedio azido (126 mg) descrito anteriormente se disolvió en DMSO (1,5 mL) y agua (0,4 mL), y se hizo reaccionar con 60 mg de 4-(*N*-maleimidometil)-*N*-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida y 15 mg de bromuro cuproso y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. La cromatografía flash, tras el trabajo de la mezcla de reacción, proporcionó 116 mg (rendimiento del 75%) del producto de la cicloadición. HPLC: t_R 11,20 min; espectro de masas electrospray: M+H y M+Na a m/z 1433 y 1456, respectivamente. Finalmente, la desprotección con una mezcla de TFA (5 mL), diclorometano (1 mL), anisol (0,1 mL) y agua (0,05 mL), seguida de precipitación con éter y posterior cromatografía flash dio el producto, CL6-SN-38, como material gomoso. HPLC: t_R 9,98 min; espectro de masas electrospray: M+H y M-H (modo de iones negativos) a m/z 1333 y 1356, respectivamente.

45

Esquema 1

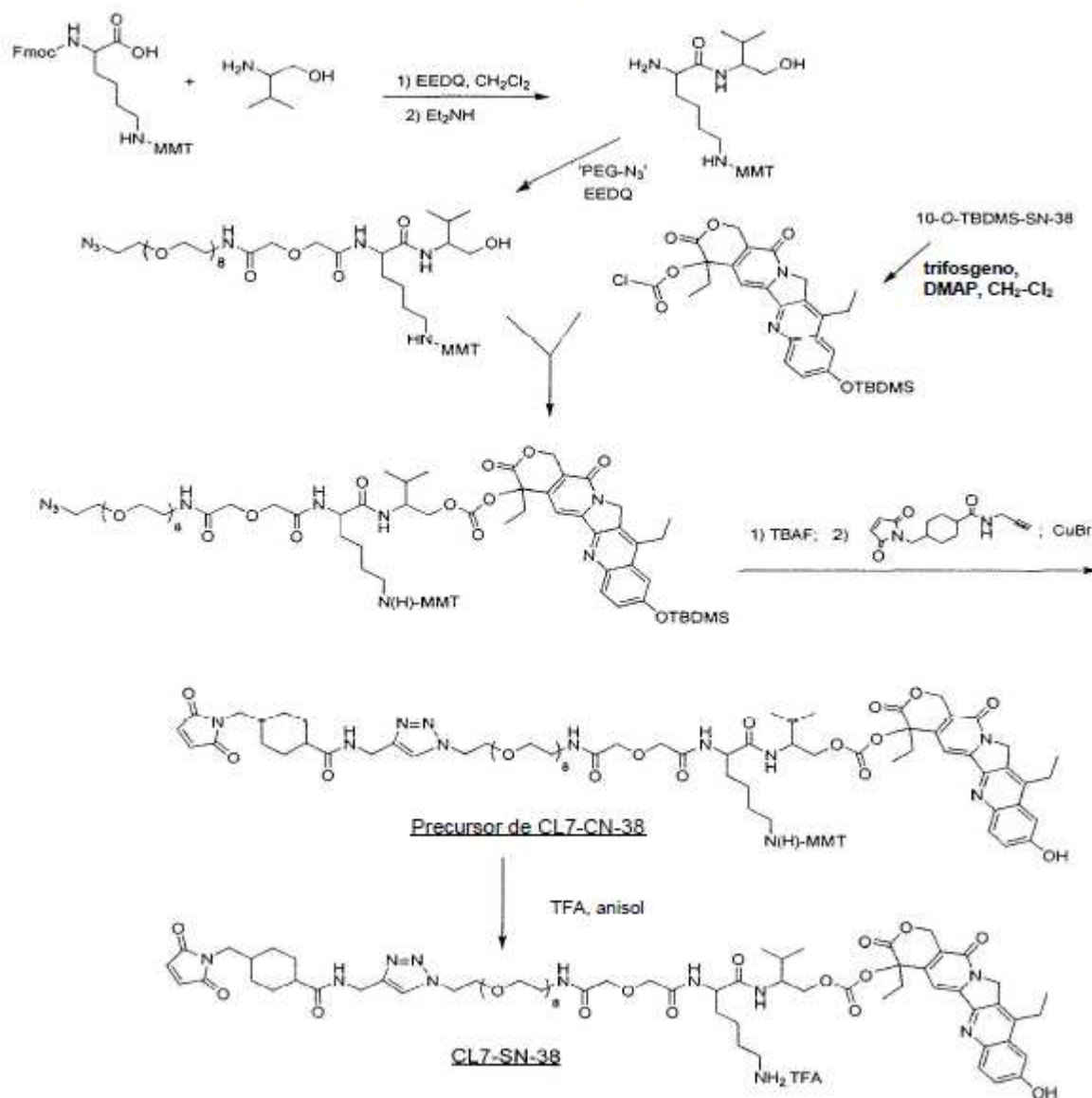
50 **Ejemplo de Referencia 2: Preparación de CL7-SN-38**

[0169] La síntesis se muestra esquemáticamente en el Esquema-2. L-Valinol (40 mg) se hizo reaccionar con Fmoc-Lys(MMT)-OH (253 mg) disponible comercialmente y EEDQ (107 mg) en 10 mL de diclorometano anhidro a temperatura ambiente, bajo argón, durante 3 h. El trabajo extractivo seguido de cromatografía flash proporcionó el producto Fmoc-Lys(MMT)-valinol como un líquido amarillo pálido (200 mg; ~ 70% de rendimiento). HPLC: t_R 14,38 min; espectro de masas electrospray: M+H: m/z 727. Este intermedio (200 mg) se desprotegió con dietilamina (10 mL), y el producto (135 mg) se obtuvo con una pureza de ~ 90% tras cromatografía flash. HPLC: t_R 10,91 min; espectro de masas electrospray: M+Na a m/z 527. Este producto (135 mg) se acopló con el O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N₃'; 150 mg, 1,1 equiv.) disponible comercialmente en presencia de EEDQ (72 mg, 1,1 equiv.) en 10 mL de diclorometano, y se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El material bruto se purificó mediante cromatografía flash para obtener 240 mg del producto purificado como un aceite amarillo claro (~ 87% de rendimiento). HPLC: t_R 11,55 min; espectro de masas electrospray: M+H y M+Na a m/z 1041 y 1063, respectivamente.

[0170] Este intermedio (240 mg) se hizo reaccionar con 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-cloroformato, este último generado a partir de 10-O-TBDMS-SN-38(122 mg) utilizando trifosgeno y DMAP. La reacción de acoplamiento se realizó en 5 mL de diclorometano durante 10 min, y la mezcla de reacción se purificó por cromatografía flash para obtener 327 mg de producto

como espuma de color amarillo pálido. Espectro de masas por electrospray: M+H a m/z 1574. El producto entero se hizo reaccionar con 0,25 mmol de TBAF en 10 mL de diclorometano durante 5 min, y la mezcla de reacción se diluyó a 100 mL y se lavó con salmuera. El producto bruto (250 mg) se disolvió en DMSO (2 mL) y agua (0,4 mL), y se hizo reaccionar con 114 mg de 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida (preparada como se describe en el Ejemplo 1) y 30 mg de bromuro cuproso y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La cromatografía flash proporcionó 150 mg del penúltimo intermedio. Finalmente, la desprotección del grupo MMT con una mezcla de TFA (0,5 mL) y anisol (0,05 mL) en diclorometano (5 mL) durante 3 min, seguida de purificación por cromatografía flash dio 69 mg de CL7-SN-38 como material gomoso. HPLC: t_R 9,60 min; espectro de masas electrospray: M+H y M-H (modo de iones negativos) a m/z 1461 y 1459, respectivamente.

Esquema 2



Ejemplo de Referencia 3: Preparación de CL6-SN-38-10-O-CO₂Et

[0171] El CL6-SN-38 del Ejemplo 1 (55,4 mg) se disolvió en diclorometano (5 mL), y se hizo reaccionar con cloroformato de etilo (13,1 mg; 11,5 μ L) y diisopropiletilamina (52,5 mg; 71 μ L), y se agitó durante 20 min bajo argón. La mezcla de reacción se diluyó con 100 mL de diclorometano y se lavó con 100 mL cada uno de HCl 0,1 M, bicarbonato sódico semisaturado y salmuera, y se secó. La cromatografía flash, tras eliminar el disolvente, proporcionó 59 mg del producto del título. HPLC: t_R 10,74 min; masa exacta: calc. 1404.6457 (M+H) y 1426.6276 (M+Na); encontrada: 1404.6464 (M+H) y 1426.6288 (M+Na).

Ejemplo de Referencia 4: Preparación de CL7-SN-38-10-O-CO₂Et

[0172] El precursor de CL7-SN-38 del Ejemplo 2 (80 mg) se convirtió en el 10-O-cloroformato utilizando el procedimiento

y la purificación descritos en el Ejemplo 3. Rendimiento: 60 mg. HPLC: t_R 12,32 min; espectro de masas electrospray: M+H y M-H (modo de iones negativos) a m/z 1806 y 1804, respectivamente. La desprotección de este material utilizando ácido dicloroacético y anisol en diclorometano dio el producto del título. HPLC: t_R 10,37 min; espectro de masas electrospray: M+H a m/z 1534.

5

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

[0173] 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 manera que el producto final está listo para la conjugación con anticuerpos sin necesidad de desproteger el grupo protector 10-OH. Este grupo se desprotege fácilmente en condiciones de pH fisiológico tras la administración in vivo del conjugado proteico. En estos conjugados, "R" puede ser un alquilo sustituido como $(CH_2)_n-N(CH_3)_2$ donde n es 2-10, o un alquilo simple como $(CH_2)_n-CH_3$ donde n es 0-10, o puede ser una fracción alcoxi como " $CH_3-(CH_2)_n-O-$ " donde n es 0-10, o una fracción alcoxi sustituida como $O-(CH_2)_n-N(CH_3)_2$ donde n es 2-10 y donde el grupo amino terminal está opcionalmente en forma de sal cuaternaria para mejorar la solubilidad acuosa, o " $R_1O-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-O-$ " donde R_1 es etilo o metilo y n es un número entero con valores de 0-10. En la versión más simple de esta última categoría, R = " $-O-(CH_2)_2-OCH_3$ ". Estos derivados 10-hidroxi se preparan fácilmente por tratamiento con el cloroformato del reactivo elegido, si el derivado final ha de ser un carbonato. Típicamente, la 10-hidroxi-conteniendo camptotecina tal como SN-38 se trata con un equivalente molar del cloroformato en dimetilformamida usando trietilamina como la base. En estas condiciones, la posición 20-OH no se ve afectada. Para la formación de ésteres 10-O se utiliza el cloruro ácido del reactivo elegido. Tales derivatizaciones se logran convenientemente usando intermedios avanzados como se ilustra para los carbonatos de etilo simples de los Ejemplos 3 y 4.

20

Ejemplo de Referencia 6: Preparación de CL6-paclitaxel

[0174] El valinol se acopla al "PEG-N3" del Esquema-1 según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El producto se hace reaccionar con 0,4 equivalente molar de trifosgeno, 3,1 equivalente molar de DMAP, en diclorometano. Tras 5 minutos, el cloroformato así formado se hace reaccionar con una cantidad equimolar de paclitaxel durante 15 minutos a temperatura ambiente. El grupo reactivo 2'-hidroxilo del paclitaxel (el grupo hidroxilo secundario de la cadena lateral) reacciona con el cloroformato del reticulante. El producto se aísla por cromatografía flash. Este intermedio (0,1 mmol) se disuelve en DMSO (1,5 mL) y agua (0,4 mL), y se hace reaccionar con 60 mg de 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida (preparada como se describe en el Ejemplo 1) y 15 mg de bromuro cuproso y se agita durante 30 min a temperatura ambiente. La cromatografía flash, tras el trabajo de la mezcla de reacción, proporciona el paclitaxel bifuncional, a saber, CL6-paclitaxel.

25

30

Ejemplo de Referencia 7: Preparación de CL7-paclitaxel

[0175] L-Valinol (40 mg) se hace reaccionar con Fmoc-Lys(MMT)-OH disponible comercialmente, y el producto se hace reaccionar a continuación con O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N3'), tal como se describe en el Ejemplo 2. El cloroformato de este derivado se forma por el método del Ejemplo 6 y se hace reaccionar con una cantidad equimolar de paclitaxel. El grupo reactivo 2'-hidroxilo del paclitaxel (el grupo hidroxilo secundario de la cadena lateral) reacciona con el cloroformato del reticulante. A continuación, se realiza la cicloadición por clic, utilizando 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida (preparada como se describe en el Ejemplo 1) de forma similar a la descrita en el Ejemplo 6, y el producto se trata finalmente con ácido dicloroacético y anisol para efectuar la eliminación del grupo "MMT" en condiciones suaves. Este proceso proporciona CL7-paclitaxel.

40

45

Ejemplo de Referencia 8: Preparación de CL6-[morfolino doxorubicina]

[0176] El valinol se acopla al "PEG-N3" del Esquema-1 según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El producto se hace reaccionar con 0,4 equivalente molar de trifosgeno, 3,1 equivalente molar de DMAP, en diclorometano. Después de 5 minutos, el cloroformato así formado se hace reaccionar con una cantidad equimolar de morfolino doxorubicina durante 15 minutos a temperatura ambiente. El grupo hidroxilo primario de la doxorubicina morfolina reacciona con el cloroformato del reticulante. El producto se aísla por cromatografía flash. Este intermedio (0,1 mmol) se disuelve en DMSO (1,5 mL) y agua (0,4 mL), y se hace reaccionar con 60 mg de 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida (preparada como se describe en el Ejemplo 1) y 15 mg de bromuro cuproso y se agita durante 30 min a temperatura ambiente. La cromatografía flash, tras el trabajo de la mezcla de reacción, proporciona el paclitaxel bifuncional, a saber, CL6-[morfolino doxorubicina].

50

55

Ejemplo de Referencia 9: Preparación de CL7-[morfolino doxorubicina]

[0177] L-Valinol (40 mg) se hace reaccionar con Fmoc-Lys(MMT)-OH disponible comercialmente, y el producto se hace reaccionar a continuación con O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N3'), como se describe en el Ejemplo 2. El cloroformato de este derivado se forma por el método del Ejemplo 6 y se hace reaccionar con una cantidad equimolar de morfolino doxorubicina. El grupo hidroxilo primario de la doxorubicina morfolina reacciona con el cloroformato del reticulante. A continuación, se realiza la cicloadición por clic, utilizando 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida (preparada como se describe en el Ejemplo 1) de forma similar a la descrita en el Ejemplo 6, y el producto se trata finalmente con ácido dicloroacético y anisol para efectuar la eliminación del grupo "MMT"

60

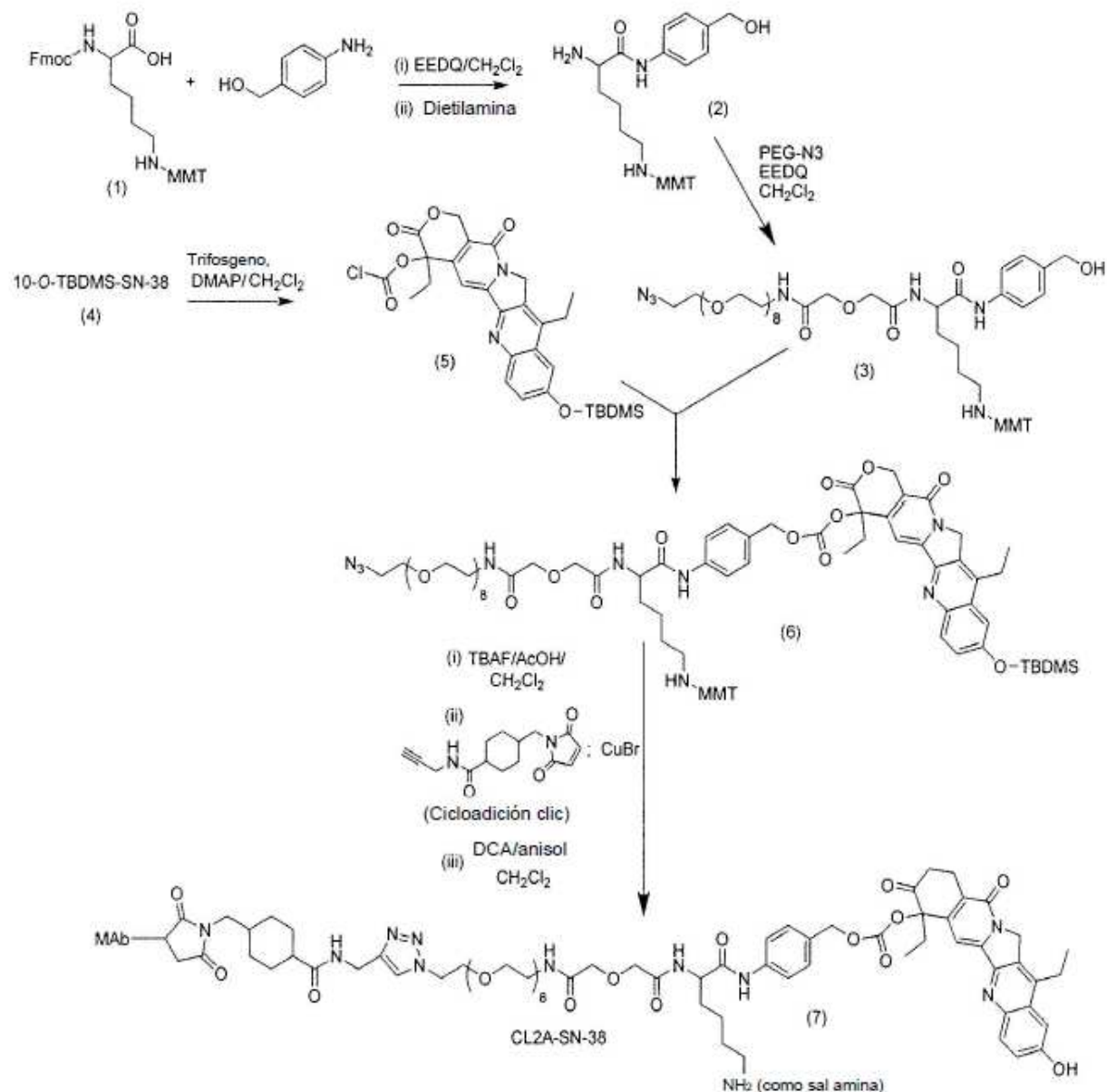
65

en condiciones suaves. Este proceso proporciona CL7-[morfolino doxorrubicina].

Ejemplo 10: Preparación de CL2A-SN-38

- 5 **[0178]** A la mezcla de Fmoc-Lys(MMT)-OH comercial (0,943 g), alcohol *p-aminobencílico* (0,190 g) en cloruro de metileno (10 mL) se añadió EEDQ (0,382 g) a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h. El trabajo de extracción seguido de cromatografía flash produjo 1,051 g de material como espuma blanca. Todos los análisis por HPLC se realizaron por el método B, como se indica en "Generalidades" en la sección 0148. Tiempo ret. HPLC : 3,53 min., El espectro de masas Electro spray mostró picos a m/e 745,8 (M+H) y m/e 780,3 (M+Cl⁺), consistentes con la estructura. Este intermedio (0,93
- 10 g) se disolvió en dietilamina (10 mL) y se agitó durante 2 h. Tras eliminar el disolvente, el residuo se lavó con hexano para obtener 0,6 g del intermedio ((2) en Esquema-3) como precipitado incoloro (91,6% de pureza por HPLC). Tiempo ret. HPLC : 2,06 min. El espectro de masas por electro spray mostró picos en m/e 523,8 (M+H), m/e 546,2 (M+Na) y m/e 522,5 (M-H).
- 15 **[0179]** Este intermedio crudo (0,565 g) se acopló con O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N3', 0,627 g) disponible comercialmente usando EEDQ en cloruro de metileno (10 mL). La eliminación del disolvente y la cromatografía flash dieron 0,99 g del producto ((3) en Esquema-3; aceite amarillo claro; 87% de rendimiento). Tiempo ret. HPLC : 2,45 min. El espectro de masas por electro spray mostró picos en m/e 1061,3 (M+H), m/e 1082,7 (M+Na) y m/e 1058,8(M-H), coherentes con la estructura. Este intermedio (0,92 g) se hizo reaccionar con 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-
- 20 cloroformato ((5) en Esquema-3) en cloruro de metileno (10 mL) durante 10 min bajo argón. La mezcla se purificó mediante cromatografía flash para obtener 0,944 g como aceite amarillo claro ((6) en Esquema-3; rendimiento = 68%). Tiempo ret. HPLC : 4,18 min. A este intermedio (0,94 g) en cloruro de metileno (10 mL) se añadió la mezcla de TBAF (1M en THF, 0,885 mL) y ácido acético (0,085 mL) en cloruro de metileno (3 mL), después se agitó durante 10 min. La mezcla se diluyó con cloruro de metileno (100 mL), se lavó con citrato sódico 0,25 M y salmuera. La eliminación del disolvente dio 0,835 g
- 25 de producto aceitoso amarillo. Tiempo ret. HPLC : 2,80 min, (pureza del 99%). El espectro de masas por electro spray mostró picos en m/e 1478 (M+H), m/e 1500,6 (M+Na), m/e 1476,5 (M-H), m/e 1590,5 (M+TFA), coherentes con la estructura.
- 30 **[0180]** Este intermedio SN-38 azido-derivatizado (0,803 g) se hizo reaccionar con 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1- carboxamida (0,233 g) en cloruro de metileno (10 mL) en presencia de CuBr (0,0083 g.), DIEA (0,01 mL) y trifetilfosfina (0,015 g), durante 18 horas. El trabajo extractivo, incluyendo el lavado con EDTA 0,1M (10 mL), y la cromatografía flash produjo 0,891 g como espuma amarilla. (rendimiento = 93%), tiempo de retardo HPLC : 2,60 min. El espectro de masas por electro spray mostró picos a m/e 1753,3 (M+H), m/e 1751,6 (M-H), 1864,5 (M+TFA), coherentes con la estructura. Finalmente, la desprotección del penúltimo intermedio (0,22 g) con una mezcla de ácido dicloroacético
- 35 (0,3 mL) y anisol (0,03 mL) en cloruro de metileno (3 mL), seguida de precipitación con éter dio 0,18 g (97% de rendimiento) de CL2A-SN-38; (7) en el Esquema-3) como polvo amarillo claro. Tiempo ret. HPLC : 1,88 min. El espectro de masas por electro spray mostró picos a m/e 1480,7 (M+H), 1478,5 (M-H), coherentes con la estructura.

Esquema 3: preparación de CL2A-SN-38



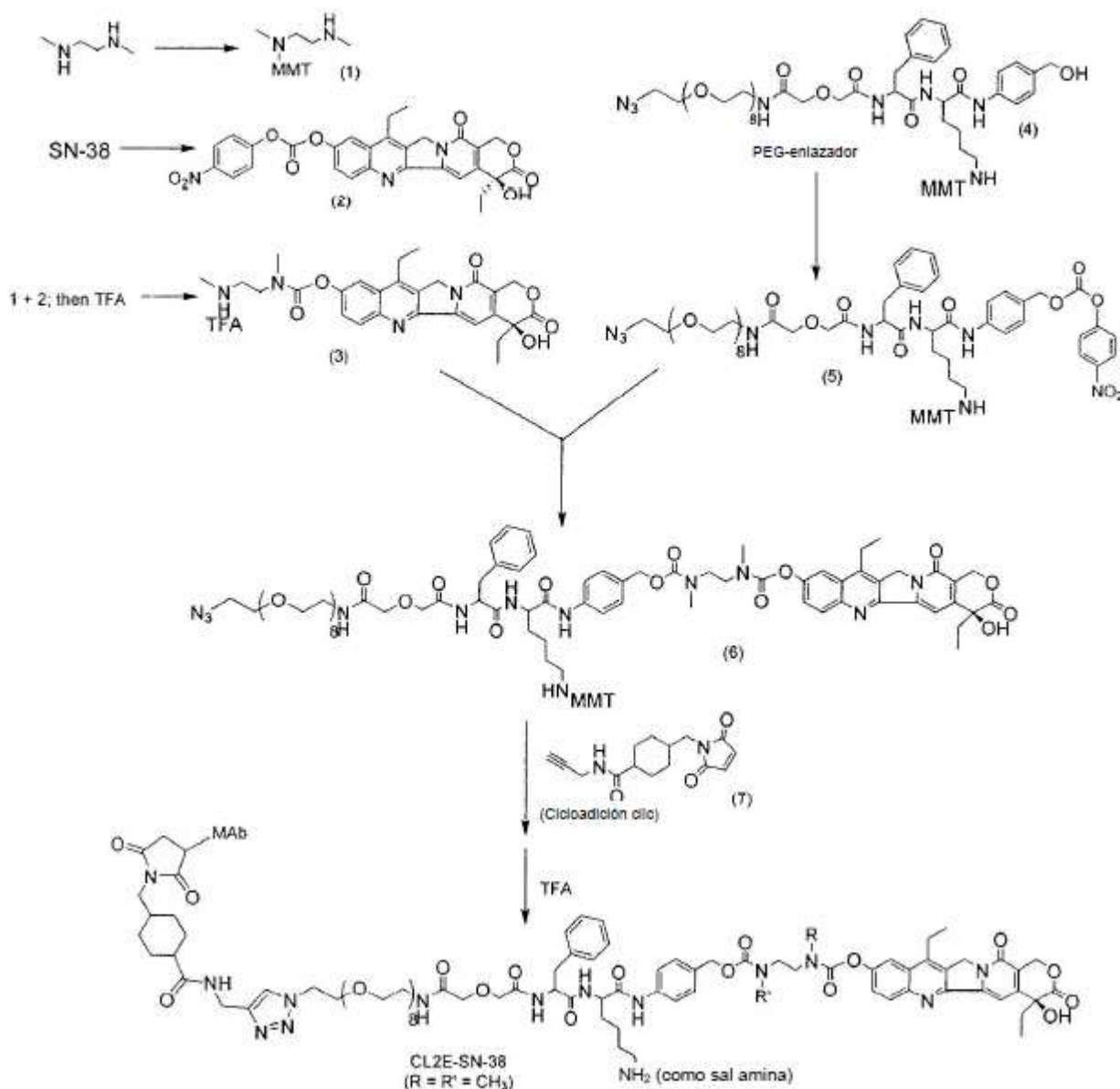
Ejemplo de Referencia 11: Preparación de CL2E-SN-38

[0181] N,N'-dimetiletilendiamina (3 mL) en cloruro de metileno (50 mL) se hizo reaccionar con cloruro de monometoxitritilo (1,7g). Tras 1 h de agitación, el disolvente se eliminó a presión reducida y el producto bruto se recuperó por extracción (aceite amarillo; 2,13 g). Todos los análisis por HPLC se realizaron por el método B, como se indica en "Generalidades" en la sección 0148. Tiempo ret. HPLC : 2,28 min. Este intermedio ((1) en Esquema-4; 0,93 g) se añadió *in situ* a SN-38 activado, y este último ((2) en Esquema-4) se preparó haciendo reaccionar SN-38 (0,3 g) con p-nitrofenilclorocromato (0,185 g) y DIEA (0,293 mL) en DMF durante 1 h. Tras eliminar el disolvente, el residuo se purificó sobre gel de sílice desactivado para obtener 0,442 g como sólido blanco.

[0182] Este intermedio (0,442 g) se desprotegió con una mezcla de ácido trifluoroacético (1 mL) y anisole (0,1 mL) en cloruro de metileno (5 mL), seguido de precipitación con éter para obtener 0,197 g del producto ((3) en Esquema-4) como sólido blanco. Este intermedio ((3); 0,197 g) se acopló con un enlazador PEG incorporado que contenía un dipéptido azida activado ((5) en el esquema 4), cuya activación se realizó haciendo reaccionar el enlazador PEG ((4) en el esquema 4; 0,203 g) con carbonato de bis(4-nitrofenilo) (0,153 g) y DIEA (0,044 mL) en cloruro de metileno (8 mL). Mediante cromatografía flash se obtuvieron 0,2 g de producto intermedio SN-38 derivatizado con azida ((6) en Esquema-4) como

sólido vítreo. Tiempo ret. HPLC : 2,8 min. El espectro de masas por electrospray mostró picos en m/e 1740,5 (M+H), m/e 1762,9 (M+Na), m/e 1774,9 (M+Cl), coherentes con la estructura. Este intermedio ((6) en Esquema-4; 0,2 g) se sometió a cicloadición click con 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1- carboxamida (0,067 g) en cloruro de metileno en presencia de CuBr (0,007 g), DIEA (0,008 mL) y trifenilfosfina (0,012 g) durante 18 h. El trabajo de la mezcla de reacción, que incluyó el tratamiento con EDTA 0,1M, seguido de cromatografía flash, produjo 0,08 g del penúltimo intermedio como espuma de color amarillo claro. HPLC : $t_R = 2,63$ min. El espectro de masas por electrospray mostró picos a m/e 2035,9 (M+Na⁺), m/e 2047,9 (M+Cl), coherentes con la estructura. Finalmente, la desprotección de este intermedio (0,08 g) con una mezcla de ácido trifluoroacético (0,2 mL), anisol (0,12 mL) y agua (0,06 mL) en cloruro de metileno (2 mL), seguida de precipitación con éter dio 0,051 g de producto, CL17-SN-38 (también denominado CL2E-SN-38), como polvo amarillo claro (rendimiento = 69 %). Tiempo ret. HPLC : 1,95 min., ~99 % de pureza. El espectro de masas por electrospray mostró picos a m/e 1741,1 (M+H), 1775,5 (M+Cl), coherentes con la estructura.

Esquema 4: preparación de CL2E-SN-38



Ejemplo 12: Conjugación de productos SN-38 bifuncionales con anticuerpos ligeramente reducidos

[0183] En estos estudios se utilizaron el MAb humanizado anti-CEACAM5, hMN-14, el MAb humanizado anti-CD22, hLL2, el MAb humanizado anti-CD20, hA20, el MAb humanizado anti-EGP-1, hRS7, y el MAb humanizado anti-mucina, hPAM4. Cada anticuerpo se redujo con ditioneitol (DTT), utilizado en un exceso molar de 50 a 70 veces, en 40 mM PBS, pH 7,4, que contenía 5,4 mM EDTA, a 37 °C (baño) durante 45 min. El producto reducido se purificó mediante cromatografía de

exclusión por tamaño y/o diafiltración, y se cambió a un tampón adecuado a pH 6,5. El contenido en tioles se determinó mediante el ensayo de Ellman, y se situó entre 6,5 y 8,5 SH/IgG. Alternativamente, los anticuerpos se redujeron con Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) en tampón fosfato a pH en el rango de 5-7, seguido de conjugación *in situ*. La MAb reducida se hizo reaccionar con un exceso molar de ~ 10 a 15 veces de "CL6-SN-38" del Ejemplo 1, o "CL7-SN-38" del Ejemplo 2, o "CL6-SN-38-10-O-CO₂Et" del Ejemplo 3, o "CL7-SN-38-10-O-CO₂Et" del Ejemplo 4, CL2A-SN-38 del Ejemplo 10, o CL2E-SN-38 del Ejemplo 11 utilizando DMSO al 7-15 % v/v como cosolvente, e incubando durante 20 min a temperatura ambiente. El conjugado se purificó por centrifugación SEC, paso por una columna hidrófoba y, finalmente, por ultrafiltración-diafiltración. El producto se ensayó para SN-38 por absorbancia a 366 nm y correlación con los valores estándar, mientras que la concentración de proteína se dedujo de la absorbancia a 280 nm, corregida para el desbordamiento de la absorbancia de SN-38 a esta longitud de onda. De este modo, se determinaron las proporciones de sustitución SN-38/MAB. Los conjugados purificados se almacenaron como formulaciones liofilizadas en viales de vidrio, se taparon al vacío y se guardaron en un congelador a -20 °C. En la Tabla 2 se muestran las relaciones de sustitución molar (MSR) SN-38 obtenidas para algunos de estos conjugados, que se situaban normalmente en el intervalo de 5 a 7.

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

MAB	Conjugado	MSR
hMN-14	hMN-14-[CL2A-SN-38], utilizando el fármaco-enlazador del Ejemplo 10	6.1
	hMN-14-[CL6-SN-38], utilizando el fármaco-enlazador del Ejemplo 1	6.8
	hMN-14-[CL7-SN-38], utilizando el fármaco-enlazador del Ejemplo 2	5,9
	hMN-14-[CL7-SN-38-10-O-CO ₂ Et], utilizando el enlazador de fármaco del Ejemplo 4.	5,8
	hMN-14-[CL2E-SN-38], utilizando el fármaco-enlazador del Ejemplo 11.	5,9
hRS7	hRS7-CL2A-SN-38 utilizando el fármaco-enlazador del Ejemplo 10.	5,8
	hRS7-CL7-SN-38 utilizando el fármaco-enlazador del Ejemplo 2	5,9
	hRS7-CL7-SN-38 (Et) utilizando el fármaco-enlazador del Ejemplo 4	6.1
hA20	hA20-CL2A-SN-38 utilizando el fármaco-enlazador del Ejemplo 10.	5,8
hLL2	hLL2-CL2A-SN-38 utilizando el fármaco-enlazador del Ejemplo 10	5.7
hPAM4	hPAM4-CL2A-SN-38 utilizando el fármaco-enlazador del Ejemplo 10	5,9

Ejemplo 15: Eficacia terapéutica in vivo en modelos preclínicos de carcinoma humano de páncreas o colon

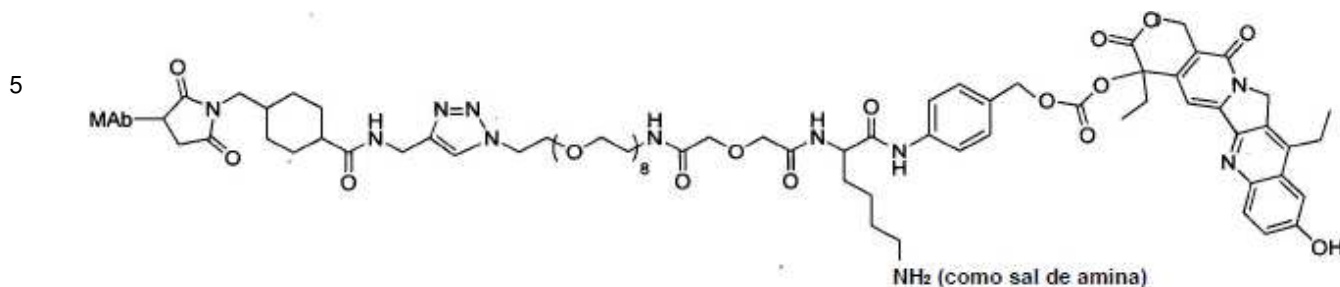
[0184] Ratones desnudos atímicos inmunocomprometidos (hembras), portadores de xenoinjertos de tumores pancreáticos o de colon humanos subcutáneos, fueron tratados con el conjugado específico CL2A-SN-38 o con el conjugado de control, o se dejaron sin tratar. Se observaron las eficacias terapéuticas de los conjugados específicos. La Figura 1 muestra un modelo de tumor pancreático Capan 1, en el que los conjugados específicos CL2A-SN-38 de los anticuerpos hRS7 (anti-EGP-1), hPAM4 (anti-mucina) y hMN-14 (anti-CEACAM5) mostraron mejores eficacias que el conjugado de control hA20-CL2A-SN-38 (anti-CD20) y el control no tratado. De forma similar, en un modelo BXPC3 de cáncer de páncreas humano, el hRS7-CL2A-SN-38 específico mostró una mayor eficacia terapéutica que los tratamientos de control (Figura 2). Asimismo, en un modelo LS174T agresivo de carcinoma de colon humano, el tratamiento con hMN-14-CL2A-SN-38 específico fue más eficaz que la ausencia de tratamiento (Figura 3).

Ejemplo de Referencia 16: Eliminación de la infección por VIH mediante tratamiento con un conjugado SN-38 de un MAB anti-gp120

[0185] Un MAB dirigido a la proteína de la envoltura del VIH gp120, anticuerpo anti-gp120 como P4/D10, se reduce utilizando las condiciones descritas en el Ejemplo 7, y el MAB reducido se hace reaccionar con un exceso molar 20 veces mayor del enlazador de fármaco CL7-SN-38, que es como se describe en el Ejemplo 2. Se obtiene un conjugado anti-gp120-SN-38 con una sustitución de ~ 8 moléculas de fármaco por anticuerpo. Se realiza un ensayo *in vitro* de inhibición del VIH con dicho conjugado utilizando diversas mezclas de células Jurkat-T no infectadas y células Jurkat T totalmente infectadas por el VIH (en proporciones de 99,8:0,2 a 95:5), y tratándolas con diluciones seriadas del conjugado, del control no específico del conjugado hRS7-CL7-SN38, del anticuerpo desnudo y del 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. Este experimento muestra una inhibición fuerte y específica de la propagación intercelular del VIH por el conjugado de fármaco específico. La eficacia *in vivo* se comprueba 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 inmunconjugado. Las células peritoneales se recogen 10 días después. Mientras que en los ratones de control se demuestra la presencia de VIH infeccioso, 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 que tiene una fórmula estructural de MAb-CL2A-SN-38, con una estructura representada por:



para uso en terapia.

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

5 CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64,
CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM5, CEACAM-6, alfa-
fetoproteína (AFP), VEGF, fibronectina ED-B, EGP-1, EGP-2, receptor EGF (ErbB1), ErbB2, ErbB3, Factor H, FHL-1, Flt-
3, receptor de folato, Ga 733, GROB, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF), HM1.24, factor de crecimiento similar a
10 la insulina (IGF), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-2R, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15,
IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, IGF-1R, Ia, gangliósidos, HCG, HLA-DR, CD66a-d, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B,
factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, factor de crecimiento
placentario (PIGF), PSA (antígeno prostático específico), PSMA, antígeno PAM4, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM,
KS-1, Le(y), mesotelina, S100, tenascina, TAC, antígeno Tn, antígenos Thomas-Friedenreich, antígenos de necrosis
tumoral, antígenos de angiogénesis tumoral, TNF- α , receptor TRAIL (R1 y R2), VEGFR, RANTES, T101, antígenos de
células madre cancerosas, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5 y un producto oncogénico.

11. El conjugado para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que la terapia inhibe el crecimiento, la progresión
y/o la metástasis del cáncer.

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

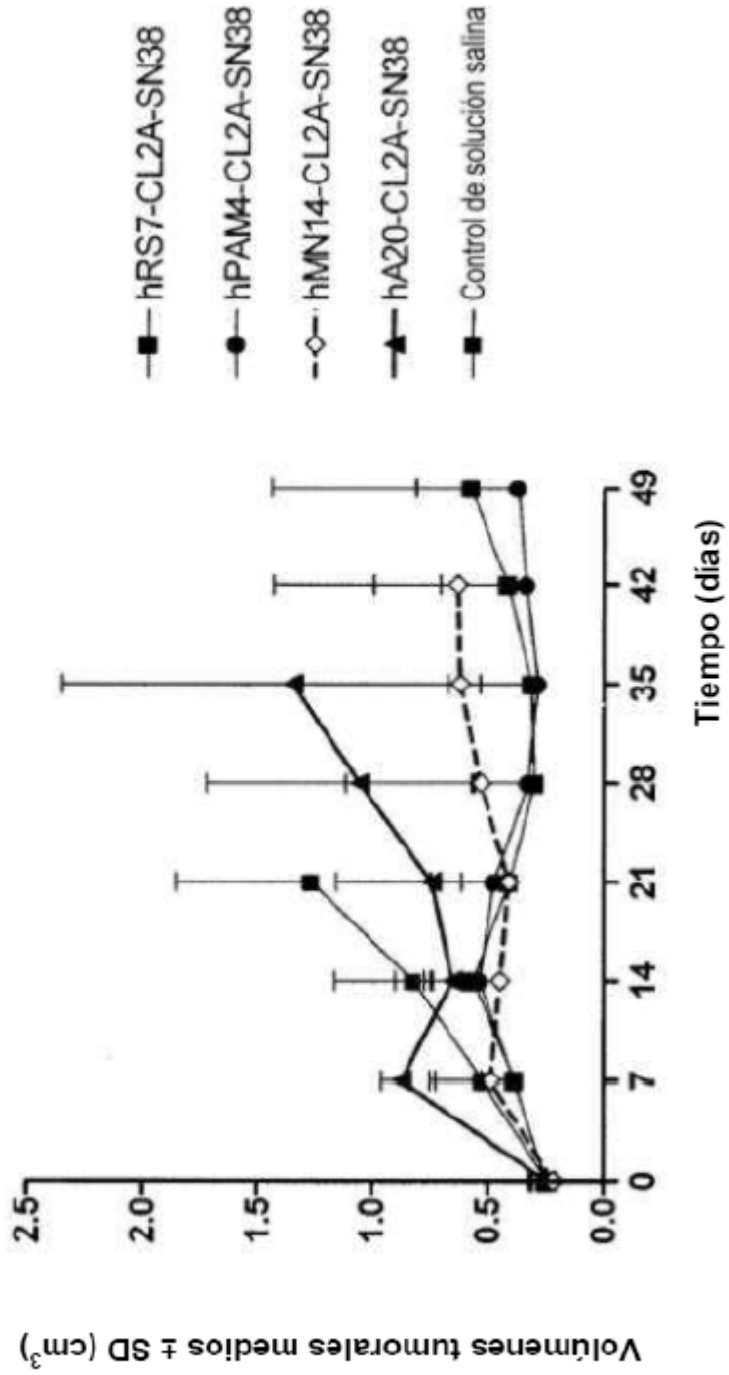


Figura 2
Eficacia terapéutica de los inmunocombinados de MAb-CL2A-SN38 en ratones portadores de xenoinjerto de adenocarcinoma pancreático humano (BxPC-3) (500 µg dos veces por semana, durante 4 semanas), n = 10

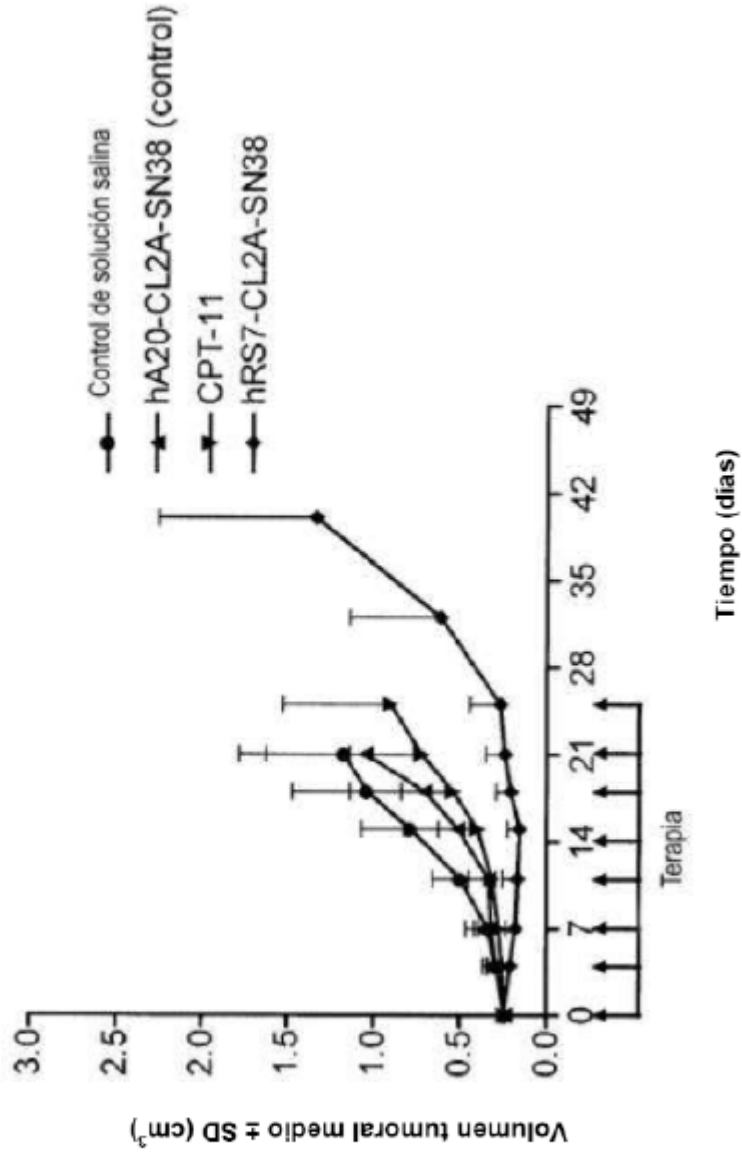


Figura 3
Eficacia terapéutica de hMN-14-CL2A-SN38 en el cáncer colorrectal humano experimental (LS 174T)
 (500 mg, i.p., dos veces por semana, durante 2 semanas), n = 10

