

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 000 111**

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 21189065 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 3939617**

54 Título: **Intermedios para preparar conjugados 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:
27.02.2025

73 Titular/es:

**IMMUNOMEDICS, INC. (100.00%)
300 American Road
Morris Plains, NJ 07950, US**

72 Inventor/es:

**GOVINDAN, SERENGULAM V.;
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 3 000 111 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

Intermedios para preparar conjugados con un enlace escindible intracelularmente

5 CAMPO

10 **[0001]** La presente divulgación se refiere a conjugados terapéuticos con una capacidad mejorada para actuar como diana sobre diversas células cancerosas, organismos de enfermedades infecciosas y/o para tratar enfermedades autoinmunes, conjugados que contienen una fracción de acción dirigida (de unión) y una fracción terapéutica que pertenece al grupo de fármacos de la camptotecina. Las fracciones de acción dirigida y terapéutica están unidas a través de un enlace escindible intracelularmente que aumenta la eficacia terapéutica.

ANTECEDENTES

15 **[0002]** Durante muchos años, un objetivo de los científicos en el campo de la terapia con fármacos específicamente dirigidos ha sido el uso de anticuerpos monoclonales (MAb) para la administración específica de agentes tóxicos a cánceres humanos. Se han desarrollado conjugados de MAb 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 enfermedades infecciosas y autoinmunes. El agente tóxico es más comúnmente un fármaco quimioterapéutico, aunque también se han conjugado radionúclidos emisores de partículas, o toxinas bacterianas o vegetales con MAb, 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 utilizar los conjugados de fármaco quimioterapéutico-MAb son que (a) el fármaco quimioterapéutico en sí está bien definido estructuralmente; (b) el fármaco quimioterapéutico está unido a la proteína MAb utilizando químicas de conjugación muy bien definidas, a menudo en sitios específicos alejados de las regiones de unión al antígeno de los MAb; (c) los conjugados de fármaco quimioterapéutico-MAb se pueden elaborar de forma más reproducible que los conjugados químicos que implican MAb y toxinas bacterianas o vegetales, y como tales son más susceptibles al desarrollo comercial y la aprobación regulatoria; y (d) los conjugados de fármaco quimioterapéutico-MAb son órdenes de magnitud menos tóxicos sistémicamente que los conjugados de MAb radionucleidos.

35 **[0004]** Los primeros trabajos sobre conjugados proteína-fármaco indicaron que un fármaco se libera preferiblemente en su forma original, una vez que se ha internalizado en una célula diana, para que el conjugado proteína-fármaco quimioterapéutico sea un agente terapéutico útil. Trouet et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 79:626-629 (1982)) demostraron la ventaja de utilizar enlaces peptídicos específicos, entre el fármaco y la fracción de destino, que se escinden lisosomalmente para liberar el fármaco intacto. En particular, los conjugados de fármacos quimioterapéuticos MAb preparados utilizando enlaces suaves escindibles por ácidos, como los que contienen una hidrazona, se desarrollaron basándose en la observación de que el pH dentro de los tumores era a menudo inferior al pH fisiológico normal (Willner et al., Patente de EE. UU. 5.708.146; Trail et al. (Science 261:212-215 (1993)). El primer conjugado de fármaco-MAb aprobado, Gemtuzumab Ozogamicin, incorpora un enlace de hidrazona similar a ácido lábil entre un anticuerpo anti-CD33, P67.6 humanizado, y un potente derivado de caliqueamicina. Sievers et al., J Clin Oncol. 19:3244-3254 (2001); Hamann et al., Bioconjugate Chem. 13:47-58 (2002). En algunos casos, los conjugados de fármaco quimioterapéutico-MAb se elaboraron con enlaces disulfuro impedidos reductivamente lábiles entre los fármacos quimioterapéuticos y el MAb (Liu et al., Proc Natl Acad Sci. EE. UU. 93: 8618-8623 (1996)).

45 **[0005]** Otro enlazador escindible incluye espaciadores dipeptídicos lábiles a la catepsina B, como Phe-Lys o Val-Cit, similares a los espaciadores peptídicos lábiles lisosomalmente de Trouet *et al.* que contienen de uno a cuatro aminoácidos, que además incorporaron un espaciador colapsable entre el fármaco y el dipéptido (Dubowchik, et al., Bioconjugate Chem. 13:855-869 (2002); Firestone et al., Patente de EE. UU. 6.214.345 B1; Doronina et al., Nat Biotechnol. 21:778-784 (2003)). Los últimos enfoques también se utilizaron en la preparación de un inmunoconjugado de camptotecina (Walker et al., BioorgMed Chem Lett. 12:217-219 (2002)). Otra fracción escindible que se ha explorado es un enlace éster incorporado en el enlace entre el anticuerpo y el fármaco quimioterapéutico. Gillimard y Saragovi han descubierto que cuando un éster de paclitaxel se conjugaba con un anticuerpo monoclonal anti-p75 de rata, MC192, o un anticuerpo monoclonal anti-TrkA humano, 5C3, se descubrió que el conjugado exhibía toxicidad específica del objetivo. Gillimard y Saragovi, Cancer Res. 61:694-699 (2001).

50 **[0006]** Los conjugados de la presente invención poseen una mayor eficacia, en muchos casos, que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos no conjugados o "desnudos", aunque dichas moléculas de orientación 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 linfomas (CAMPATH® y RITUXAN®), cáncer colorrectal y otros cánceres (ERBITUX® y AVASTIN®), cáncer de mama (HERECEPTIN®), así como un gran número de ellos que actualmente se encuentran en desarrollo clínico (por ejemplo, epratuzumab). En la mayoría de estos casos, el uso clínico ha implicado la combinación de estos anticuerpos desnudos o no conjugados con otras terapias, como quimioterapia o radioterapia.

65

[0007] También se utilizan diversos anticuerpos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y otras enfermedades inmunológicas desreguladoras, como los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral (TNF) y 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. También se están estudiando anticuerpos desnudos en la sepsis y el choque 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), quienes resumen los patógenos prioritarios contra los cuales se ha buscado la terapia con anticuerpos desnudos, dando como resultado solo 2 patógenos contra los cuales los anticuerpos están en ensayos clínicos de Fase III o están siendo comercializados (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 fracciones de unión. Dichas terapias mediadas por anticuerpos se pueden desarrollar para el tratamiento de muchos patógenos diferentes, incluidas bacterias, hongos, virus y parásitos, ya sea como conjugados desnudos (no conjugados), radiomarcados o de fármaco/toxina. Existe además la necesidad 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 administrar conjugados de fármaco/toxina o radionúclido, esto se puede lograr mediante conjugación directa de anticuerpos o mediante métodos indirectos, conocidos como pre-focalización, donde se utiliza un anticuerpo biespecífico para apuntar a la lesión, mientras que el agente terapéutico se dirige de manera secundaria mediante la unión a uno de los brazos del anticuerpo biespecífico que se ha localizado en el sitio del patógeno, el cáncer o cualquier 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 de direccionamiento (tal como un anticuerpo o un 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-hidroxicamptotecina (SN-38) para quimioterapia dirigida contra el cáncer. El documento WO 2007/112193 se refiere a conjugados terapéuticos para dirigirse a diversas células enfermas que contienen una fracción de direccionamiento (tal como un anticuerpo o un 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 de direccionamiento y una fracción terapéutica. Las fracciones de direccionamiento y terapéutica están unidas a través de un enlace escindible por ácido.

RESUMEN

[0010] La presente invención es como 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 fracción de unión a fármacos. Los métodos y composiciones divulgados son útiles para el tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones que son refractarias o menos sensibles a otras formas de terapia, y pueden incluir enfermedades contra las que se pueden desarrollar fracciones de direccionamiento (unión) adecuadas para el direccionamiento selectivo, o están disponibles o se conocen. Preferiblemente, la fracción de direccionamiento es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo biespecífico u otro anticuerpo multivalente, u otra molécula o compuesto basado en anticuerpos. El anticuerpo puede ser de varios isotipos, preferiblemente IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4 o IgA, y puede ser un anticuerpo quimérico humano-ratón, un anticuerpo quimérico humano-primate, un anticuerpo humanizado (regiones hipervariables (CDR) murinas y de marco humano) o completamente humano, así como variaciones de los mismos, como anticuerpos de media IgG4 (denominados "unicuerpos"), como describen van der Neut Kofschoten et al. (Science 2007; 317:1554-1557). Sin embargo, se pueden utilizar otras fracciones de unión conocidas en la técnica, como aptámeros, avímeros o péptidos de orientación. Las enfermedades o afecciones preferidas contra las que existen dichas fracciones de orientación son, por ejemplo, cáncer, afecciones desreguladoras inmunológicas, incluidas enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias, y enfermedades causadas por organismos infecciosos.

[0011] Los métodos y composiciones descritos pueden aplicarse así para el tratamiento de enfermedades y afecciones para las que las fracciones de direccionamiento son útiles para administrar agentes citotóxicos. Dichas enfermedades o afecciones pueden caracterizarse por la presencia de una molécula o célula diana que no se ve suficientemente afectada cuando se utilizan fracciones de direccionamiento no conjugadas o desnudas, como en la inmunoterapia del cáncer o de la infección con organismos patógenos. (Para métodos de elaboración de inmunoconjugados de anticuerpos con isótopos, fármacos y toxinas para su uso en terapias de enfermedades, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. números 4.699.784; 4.824.659; 5.525.338; 5.677.427; 5.697.902; 5.716.595; 6.071.490; 6.187.284; 6.306.393; 6.548.275; 6.653.104; 6.962.702; 7.033.572; 7.147.856; 7.259.240 y las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. números 20050175582 (ahora abandonada); 20050136001; 20040166115 (ahora abandonada); 20040043030 (ahora abandonada); 20030068322 (ahora abandonada) y 20030026764 (ahora abandonada)).

[0013] Camptotecina (CPT) y sus análogos y derivados son fracciones quimioterapéuticas preferidas. Otras fracciones quimioterapéuticas son taxanos (p. ej., baccatina III, taxol), epotilonas, fármacos antraciclínicos (p. ej., doxorubicina

(DOX), epirrubicina, morfolinodoxorrubicina (morfolino-DOX), cianomorfolino-doxorrubicina (cianomorfolino-DOX) y 2-pirrolinodoxorrubicina (2-PDOX); véase Priebe W (ed.), ACS symposium series 574, publicado por American Chemical Society, Washington DC, 1995 (332pp) y Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 93:2464-2469, 1996), ansamicinas benzoquinoides ejemplificadas por geldanamicina (DeBoer et al., Journal of Antibiotics 23:442-447, 1970; Neckers et al., Invest. New Drugs 17:361-373, 1999), y similares. La fracción de direccionamiento se enlaza a al menos una fracción quimioterapéutica; preferiblemente de 1 a aproximadamente 5 fracciones quimioterapéuticas; lo más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 12 fracciones quimioterapéuticas.

[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 sido 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 JG, Giovanella, BC y Verschraegen (eds), NY Acad Sci., NY 922 :136-150 (2000)). Este enfoque se basa en la difusión pasiva de una molécula polimérica en los sitios tumorales. También se ha informado de que esta conjugación de glicina es un método para elaborar un derivado soluble en agua de CPT (Vishnuvajjala et al., patente de EE. UU. n.º 4.943.579) y en la preparación de una CPT derivada de 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 de CPT solubles en agua y de acción prolongada, con lo que se mejora 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 un derivado de CPT soluble en agua es CPT-11. Se dispone de datos clínicos extensos sobre la farmacología de CPT-11 y su conversión *in vivo* en la forma activa SN-38 (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 aproximadamente de 2 a 3 órdenes de magnitud más potente que CPT-11.

[0014] Los conjugados farmacológicos de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden utilizar para dirigir el fármaco terapéutico a patógenos, tales como bacterias, virus, hongos y parásitos. Dichas fracciones de direccionamiento conjugadas con fármacos se pueden utilizar en combinación con otras modalidades terapéuticas, tales como fármacos antifúngicos, antibióticos y antivirales y/o anticuerpos desnudos, inmunomoduladores (por ejemplo, interferones, interleucinas y/o citocinas). El uso de radioinmunoterapia para el tratamiento de organismos infecciosos se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.º 4.925.648; 5.332.567; 5.439.665; 5.601.825; 5.609.846; 5.612.016; 6.120.768; 6.319.500; 6.458.933; 6.548.275; y en las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. números 20020136690 y 20030103982.

[0015] En el tratamiento del cáncer, los conjugados de fármacos pueden utilizarse en combinación con cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia con anticuerpos desnudos, radioinmunoterapia, inmunomoduladores, vacunas y similares. Se prefieren combinaciones similares en el tratamiento de otras enfermedades susceptibles de actuar sobre fracciones diana, como las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, los conjugados de camptotecina pueden combinarse con inhibidores de TNF, anticuerpos de 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 de combinación pueden permitir que se administren dosis más bajas de cada agente terapéutico en dichas combinaciones, reduciendo así ciertos efectos secundarios graves y reduciendo potencialmente los ciclos de terapia necesarios. En las enfermedades virales, los inmunoconjugados de fármacos se pueden combinar con otros fármacos terapéuticos, inmunomoduladores, MAbs desnudos o vacunas (por ejemplo, MAbs contra virus de la hepatitis, VIH o papiloma, o vacunas basadas en inmunógenos de estos virus). Los anticuerpos y las vacunas basadas en antígenos contra estos y otros patógenos virales son conocidos en la técnica y, en algunos casos, ya se utilizan comercialmente.

[0016] La invención se refiere a un proceso de preparación de conjugados, en el que un fármaco se derivatiza primero con un primer enlazador, cuyo primer enlazador contiene una fracción reactiva que es capaz de combinarse con un segundo enlazador que contiene adicionalmente un grupo de acoplamiento de fracción de direccionamiento; en el que el primer enlazador también posee una fracción de polietilenglicol (PEG) definida para la solubilidad en agua, y una fracción escindible intracelularmente escindible por peptidasas intracelulares o escindible por el entorno de bajo pH de vesículas endosómicas y lisosómicas, y 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 de fármaco (primer enlazador) mediante la reacción de cicloadición de acetileno-azida catalizada por iones de cobre (+1), denominada "química de clic". La fracción de PEG definida es un PEG de bajo peso molecular con un número definido de subunidades monoméricas, como se analiza a continuación.

[0017] A veces, en un proceso de preparación de conjugados como el discutido en el párrafo anterior, el segundo enlazador tiene un solo grupo de acoplamiento de fracción de direccionamiento, pero múltiples del grupo reactivo capaces de reaccionar con el conjugado de fármaco (primer enlazador), amplificando así el número de moléculas de fármaco conjugadas con la fracción de direccionamiento.

[0018] A veces, en un proceso de preparación de conjugados, el enlazador se conjuga primero con un fármaco, produciendo así un conjugado de fármaco-enlazador; en donde dicha preparación de conjugado de fármaco-enlazador implica la protección y desprotección selectiva de un grupo más reactivo en un fármaco que contiene múltiples grupos

funcionales; en donde dicho conjugado de fármaco-enlazador opcionalmente no está purificado; y en donde dicho conjugado de fármaco-enlazador se conjuga posteriormente con un anticuerpo o fragmento monoclonal.

[0019] También se proporciona un método para tratar el cáncer (malignidad), una enfermedad autoinmune, una infección o una lesión infecciosa con los conjugados descritos en este documento. Los conjugados de grupos dirigidos a fármacos pueden prepararse mediante los procesos. A veces se utilizan kits para realizar los procesos.

[0020] A veces, un inmunoconjugado comprende:

(a) una fracción de direccionamiento;
 (b) una fracción quimioterapéutica; y
 (c) un enlazador unido covalentemente a la fracción de direccionamiento a través de un grupo de unión a la fracción de direccionamiento y a la fracción quimioterapéutica a través de una fracción escindible intracelularmente.

A veces, un inmunoconjugado comprende:

(a) una fracción de direccionamiento;
 (b) una fracción quimioterapéutica; y
 (c) un enlazador unido covalentemente a la fracción de direccionamiento a través de un grupo de unión a la fracción de direccionamiento y a la fracción quimioterapéutica a través de una fracción escindible intracelularmente; en donde dicha unión del enlazador a la fracción terapéutica comprende además un L-aminoácido o un polipéptido formado por hasta cuatro L-aminoácidos.

[0021] A veces, la fracción escindible 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 agente de reticulación que termina en el grupo de unión de la fracción de direccionamiento; y en donde la fracción de etanolamina sustituida se deriva de un aminoácido L natural, con el grupo de ácido carboxílico de este último reemplazado con una fracción de hidroximetilo; y en donde el alcohol 4-aminobencílico está opcionalmente sustituido con un grupo alquilo C₁-C₁₀ en la posición bencílica.

[0022] A veces, la fracción escindible 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 un polipéptido que comprende hasta cuatro fracciones de L-aminoácido; en donde el extremo N está unido a un reticulante que termina en el grupo de unión de la fracción de direccionamiento; y en donde la fracción de etanolamina sustituida se deriva opcionalmente de un L-aminoácido, con el grupo de ácido carboxílico de esta última reemplazado por una fracción de hidroximetilo.

[0023] La fracción escindible intracelularmente es un carbonato que comprende un grupo hidroxilo activado de la fracción quimioterapéutica y un alcohol 4-aminobencílico, y este último, a través de su grupo amino, está unido a un L-aminoácido; en donde el extremo N está unido a un agente de reticulación que termina en el grupo de unión de la fracción de direccionamiento.

[0024] A veces, 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 un polipéptido que comprende hasta cuatro fracciones de L-aminoácido; en donde el extremo N está unido a un agente de reticulación que termina en el grupo de unión de la fracción de direccionamiento; en donde dicha fracción de etanolamina sustituida se deriva opcionalmente de un L-aminoácido, con el grupo de ácido carboxílico de este último reemplazado con una fracción de hidroximetilo; y en donde el alcohol 4-aminobencílico está opcionalmente sustituido con un grupo alquilo C₁-C₁₀ en la posición bencílica. El derivado de fármaco bifuncional se conjuga luego con una fracción de direccionamiento para obtener un inmunoconjugado como se discutió anteriormente. Al dirigirse al sitio de la enfermedad con el inmunoconjugado, el inmunoconjugado se endocita y se cataboliza para liberar la fracción enlazadora del fármaco; en donde el grupo amino libre de la fracción de etanolamina sustituida ayuda a la liberación del fármaco libre mediante ataque nucleofílico en el grupo carbonilo de la fracción de carbamato.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0025]

FIG. 1. Terapia preclínica *in vivo* de ratones desnudos atímicos, portadores de carcinoma pancreático humano Capan 1, con conjugados MAbCL2A-SN-38.

FIG. 2. Terapia preclínica *in vivo* de ratones desnudos atímicos, portadores de carcinoma pancreático humano BxPC3, con conjugados MAbCL2A-SN-38.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

- 5 **[0026]** En la descripción que sigue, se utilizan varios términos y se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión del objeto reivindicado. Los términos que no se definen expresamente en el presente documento se utilizan de acuerdo con sus significados claros y ordinarios.
- [0027]** A menos que se especifique lo contrario, un o una significa "uno o más".
- 10 **[0028]** El término aproximadamente se utiliza en el presente documento 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.
- 15 **[0029]** El término fracción de direccionamiento como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula, complejo o agregado, que se une de forma específica o selectiva a una molécula, célula, partícula, tejido o agregado diana. El experto en la materia 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 preferencial a una diana particular. En formas de realización preferidas, una fracción de direccionamiento es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo biespecífico u otra molécula o compuesto basado en anticuerpos. Sin embargo, en la técnica se conocen otros ejemplos de fracciones de direccionamiento y se pueden utilizar, tales como aptámeros, avímeros, ligandos de unión a receptores, ácidos nucleicos, pares de unión biotina-avidina, péptidos o proteínas de unión, etc. Los términos "fracción de direccionamiento" y "fracción de unión" se utilizan como sinónimos en el presente documento.
- 20 **[0030]** Un anticuerpo, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, que se produce de forma natural o se forma mediante procesos recombinatorios de fragmentos del gen de inmunoglobulina 7 normales) (por ejemplo, un anticuerpo IgG) o una porción de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina, tal como un fragmento de anticuerpo. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede conjugarse o derivatizarse de otro modo dentro del alcance de la materia objeto reivindicada. Dichos anticuerpos incluyen, entre otros, IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4 (y subformas de IgG4), así como isotipos de IgA.
- 25 **[0031]** Un fragmento de anticuerpo es una porción de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv (Fv de cadena única), anticuerpos de dominio único (DAB o VHH) y similares, incluyendo las semimoléculas de IgG4 citadas anteriormente (van der Neut Kofschoten et al. (Science 2007; 317(14 Sept):1554-1557). Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo de uso se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye proteínas sintéticas o genéticamente modificadas que actúan como un anticuerpo al unirse a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados que consisten en las regiones variables, tales como los fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas de cadena única recombinantes en las que las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un conector peptídico ("proteínas scFv"), y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable, tales como 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 un antígeno diferente). Como se usa en el presente documento, el término componente de anticuerpo incluye un anticuerpo completo, una proteína de fusión y fragmentos de los mismos.
- 30 **[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, tales como la fijación del complemento y ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), que ponen en acción mecanismos que pueden dar como resultado la lisis celular. Sin embargo, la porción Fc puede no ser necesaria para la función terapéutica del anticuerpo, sino que otros mecanismos, tales como la apoptosis, la antiangiogénesis, la actividad antimetastásica, la actividad antiadhesión, tal como la inhibición de la adhesión heterotípica u homotípica, y la interferencia en las vías de señalización, pueden entrar en juego e interferir con 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, tales como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos y fragmentos de los mismos. Por lo tanto, en algunos casos un "anticuerpo desnudo" también puede referirse a un fragmento de anticuerpo "desnudo". Como se define en este documento, "desnudo" es sinónimo de "no conjugado" y significa no vinculado o conjugado a un agente terapéutico.
- 35 **[0033]** Las enfermedades autoinmunes son trastornos que son causados por el cuerpo que produce una respuesta inmune contra sus propios tejidos. Los ejemplos incluyen enfermedades autoinmunes de clase III, como trombocitopenias inmunomediadas, púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, corea de Sydenham, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide ampolloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis postestreptocócica, eritema nodoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía por IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, Síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, artritis reumatoide, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis de progresión rápida y alveolitis fibrosante, como se describe en la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 60/360.259, presentada el 1 de marzo de 2002.

5
10
[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 complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de una especie, preferiblemente un anticuerpo de roedor, más preferiblemente un anticuerpo murino, mientras que los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. Para aplicaciones veterinarias, los dominios constantes del anticuerpo quimérico pueden derivarse de los de otras especies, como un primate, un gato o un perro.

15
20
[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 desde las cadenas variables pesadas y ligeras del anticuerpo murino a los dominios variables pesados y ligeros humanos (regiones de estructura). Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. En algunos casos, los residuos específicos de la región de estructura del anticuerpo humanizado, en particular los que están en contacto o cerca de las secuencias de CDR, pueden modificarse, por ejemplo, reemplazarse con los residuos correspondientes del anticuerpo murino, roedor, primate subhumano u otro anticuerpo original.

25
30
35
40
[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 la cadena pesada y ligera humana en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones dirigidas de los loci endógenos de la cadena pesada y ligera. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para varios antígenos, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. Green et al., Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), y Taylor et al., Int. Immun. 6:579 (1994) describen métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos. También se puede construir un anticuerpo completamente humano mediante métodos de transfección genética o cromosómica, así como tecnología de presentación de fagos, todos los cuales son 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 anticuerpo se clonan en marco en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, y se muestran como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a 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 como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La visualización de fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión, véase, por ejemplo, Johnson y Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571 (1993). Los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante células B activadas *in vitro*. Consulte las patentes de EE. UU. números 5.567.610 y 5.229.275.

45
50
55
60
[0037] Las enfermedades infecciosas tal como se utilizan en el presente documento son enfermedades que implican infección por patógenos tales como bacterias, rickettsias, micoplasmas, protozoos, hongos, virus, parásitos u otros agentes microbianos. Los ejemplos incluyen el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) que causa el SIDA, *Mycobacterium* de tuberculosis, *Streptococcus agalactiae*, Staphylococcus aureus resistente a la meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemophilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, virus del Nilo Occidental, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, virus de la rabia, virus de la influenza, citomegalovirus, virus del herpes simple I, virus del herpes simple II, virus similar al parvovirus 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 de células T humanas, 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 Sendai, virus de la leucemia felina, virus reo, virus de la polio, virus del simio 40, virus del tumor mamario de ratón, virus del dengue, virus de la rubéola, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Babesia bovis*, *Elmeria tenella*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania tropica*, *Trichinella spiralis*, *Theileria parva*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocostoides corti*, *Mycoplasma arthritis*, *M. hyorhinis*, *M. orate*, *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. salivarium* y *M. pneumoniae*. En Casadevall, Clin Immunol 1999; 93(1):5-15 se incluye una revisión que enumera los anticuerpos contra organismos infecciosos (anticuerpos antitoxina y antivirales), así como otros objetivos.

65
[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. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, conjugados, fármacos, agentes citotóxicos, agentes proapoptóticos, toxinas,

nucleasas (incluidas las ADNAsas y ARNAsas), hormonas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes, radioisótopos o radionúclidos, oligonucleótidos, ARN de interferencia, péptidos, agentes antiangiogénicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, quimiocinas, profármacos, enzimas, proteínas de unión o péptidos o combinaciones de los mismos.

[0039] Un conjugado es un componente de anticuerpo u otra fracción de direccionamiento conjugada con un agente terapéutico, como los descritos anteriormente. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "conjugado" e "inmunoconjugado" se utilizan indistintamente.

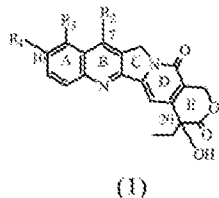
[0040] Como se utiliza en el presente documento, el término proteína de fusión de anticuerpos es una molécula de unión a antígeno producida de forma recombinante en la que uno o más anticuerpos naturales, anticuerpos monocatenarios o fragmentos de anticuerpos están unidos (fusionados) a otra fracción, tal como una proteína o toxina peptídica, citocina, hormona, etc. En ciertas formas de realización preferidas, la proteína de fusión puede comprender dos o más de los mismos o diferentes anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos monocatenarios fusionados entre sí, que pueden unirse al mismo epítipo, a diferentes epítipos en el 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 con el antígeno o los epítipos; 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 a cuántos tipos diferentes de antígeno o epítipo puede unirse una proteína de fusión de anticuerpos; es decir, monoespecífico, biespecífico, triespecífico, multiespecífico. Utilizando 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 anticuerpo. La proteína de fusión puede comprender además un agente terapéutico.

[0041] Un inmunomodulador es un agente terapéutico que, cuando está presente, altera, suprime o estimula el sistema inmunológico del cuerpo. Normalmente, un inmunomodulador de uso estimula las células inmunes para que proliferen o se activen en una cascada de respuesta inmune, 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 inmunes, como en el tratamiento terapéutico de una enfermedad autoinmune. Un ejemplo de un inmunomodulador como se describe en el presente documento es una citocina, que es una proteína pequeña soluble de aproximadamente 5-20 kDa que es liberada por una población celular (por ejemplo, linfocitos T cebados) al entrar en contacto con antígenos específicos, y que actúa como un mediador intercelular entre células. Como entenderá el experto en la materia, los ejemplos de citocinas incluyen linfocinas, monocinas, 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. Algunas 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 tal como se utiliza en la presente solicitud CPT representa la camptotecina en sí misma o un análogo o derivado de la camptotecina. Las estructuras de la camptotecina y algunos de sus análogos, con la numeración indicada y los anillos etiquetados con las letras A-E, se dan en la fórmula 1 en el Gráfico 1 a continuación.

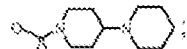
Gráfico 1

[0043]



CPT: $R_1 = R_2 = R_3 = H$

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

CPT-11: $R_1 =$  $; R_2 = \text{etil}; R_3 = H$

SN-38: $R_1 = OH; R_2 = \text{etil}; R_3 = H$

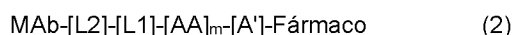
Topotecano: $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = CH_2-N(CH_3)_2$

Conjugados de camptotecina

[0044] Se idean métodos de las siguientes maneras para la preparación de conjugados de fármacos quimioterapéuticos con fracciones de direccionamiento (TM), tales como un anticuerpo (MAb). (1) La solubilidad del fármaco se mejora colocando una fracción de polietilenglicol (PEG) definida (es decir, un PEG que contiene un número definido de unidades monoméricas) entre el fármaco y el vector de direccionamiento, en donde el PEG definido es un PEG de bajo peso molecular, que contiene preferiblemente de 1 a 30 unidades monoméricas, más preferiblemente 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 porción de PEG definida con un grupo azida o acetileno en un extremo y un grupo reactivo diferente, tal como ácido carboxílico o grupo hidroxilo, en el otro extremo y dicho PEG definido bifuncional está unido al grupo amina de un aminoalcohol, y el grupo hidroxilo de este último está unido al grupo hidroxilo en el fármaco en forma de carbonato; alternativamente, la porción no azida (o acetileno) de dicho PEG bifuncional definido está opcionalmente unida al extremo N de un L-aminoácido o un polipéptido, con el extremo C unido al grupo amino del aminoalcohol, y el grupo hidroxilo de este último está unido 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 de direccionamiento 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) a través de una reacción de cicloadición de acetileno-azida para proporcionar el producto farmacológico bifuncional final que es útil para conjugarse con las fracciones de direccionamiento de la enfermedad, tales como anticuerpos de direccionamiento de la enfermedad; (4) el grupo de acoplamiento del anticuerpo está diseñado para ser un tiol o un grupo reactivo al tiol; (5) se idean métodos para la regeneración selectiva del grupo 10-hidroxilo en presencia del carbonato C-20 en preparaciones de precursor de enlazador de fármaco que involucran 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, y estos se desprotegen con fluoruro de tetrabutilamonio antes de la unión del fármaco derivatizado a una fracción de acoplamiento de vector de direccionamiento; y (6) el grupo 10-hidroxilo de los análogos de CPT se protege alternativamente como un éster o carbonato, distinto de 'BOC', de modo que el CPT bifuncional se conjuga a una fracción de direccionamiento sin desprotección previa de este grupo protector, y el grupo protector se desprotege fácilmente en condiciones de pH fisiológico después de que se administra el bioconjugado. En el acoplamiento de acetileno-azida, denominado 'química de clic', la parte de azida puede estar en L2 con la parte de acetileno en L3. Alternativamente, L2 puede contener acetileno, y L3 puede contener 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: 1128-37). La química de clic tiene lugar en solución acuosa en condiciones de pH casi neutro y, por lo tanto, es adecuada para la conjugación de fármacos. La ventaja de la química de clic es que es quimiosselectiva y complementa otras químicas de conjugación bien conocidas, como la reacción de tiolmaleimida. En la siguiente discusión, cuando un conjugado comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, se puede sustituir otro tipo de fracción de unión, como un aptámero, un avímero o un péptido de orientación.

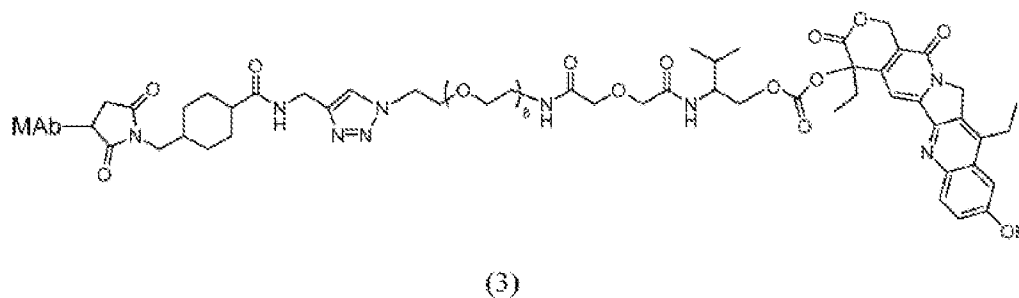
[0045] Un conjugado de un derivado de fármaco y un anticuerpo puede ser de la fórmula general 2,



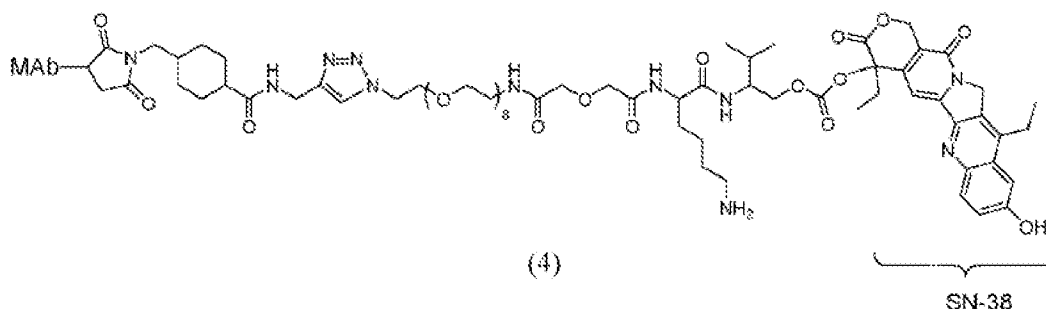
donde MAb es un anticuerpo dirigido a una enfermedad; L2 es un componente del agente de reticulación que comprende una fracción de acoplamiento de anticuerpo y uno o más grupos acetileno (o azida); L1 comprende un PEG definido con azida (o acetileno) en un extremo, complementario a la fracción acetileno (o azida) en L2, y un grupo reactivo tal como ácido carboxílico o grupo hidroxilo en el otro extremo; AA es un L-aminoácido; m es un número entero con valores de 0, 1, 2, 3 o 4; y A' es un espaciador adicional, seleccionado del grupo 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, está unido 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 donde el grupo de ácido carboxílico del aminoácido se reemplaza por una fracción de hidroximetilo. 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 la fórmula 2, m es 0, A' es L-valinol y el fármaco se ejemplifica mediante SN-38. La estructura resultante se muestra en la fórmula 3.



[0048] En otro ejemplo del conjugado de la forma de realización de la 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.

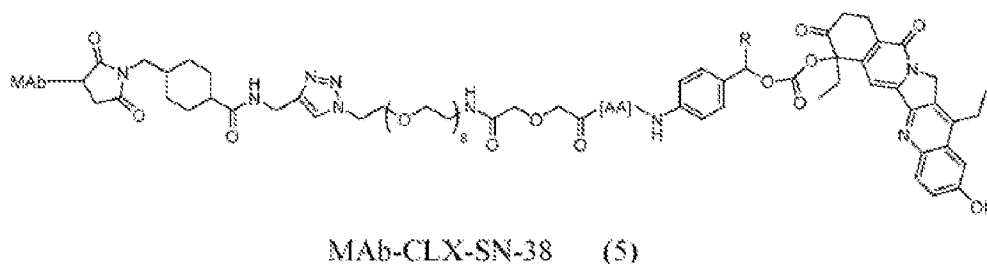


[0049] En esta forma de realización, primero se forma un enlace amida entre el ácido carboxílico de un aminoácido como la lisina y el grupo amino del valinol, utilizando grupos protectores ortogonales para los grupos amino de la lisina. Se elimina el grupo protector en el extremo N de la lisina, manteniendo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

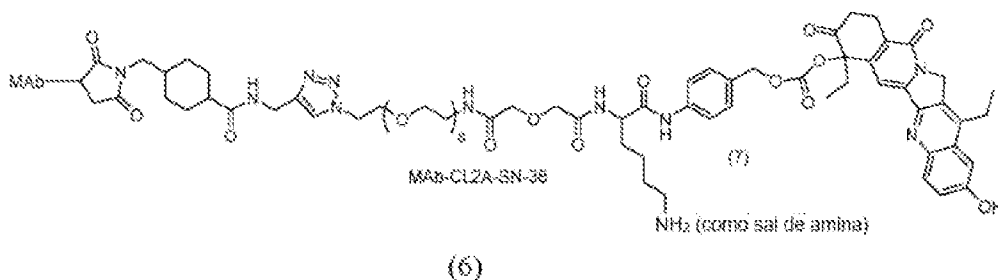
[0050] Sin querer limitarnos a la teoría, el producto SN-38 de pequeño peso molecular, concretamente el carbonato de valinol-SN-38, generado después de la proteólisis intracelular, tiene la vía adicional de liberación de SN-38 intacto a través de la ciclización intramolecular que involucra al grupo amino 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 tal como 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 un polipéptido que comprende hasta cuatro fracciones de L-aminoácido; donde el extremo N está unido a un agente de reticulación que termina en el grupo de unión de la fracción de direccionamiento.

[0052] A continuación se proporciona un ejemplo, en el que la forma de realización A-OH de A' de fórmula general (2) se deriva de alcohol 4-aminobencílico sustituido, y 'AA' está compuesto 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 único aminoácido de AA se selecciona 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. El sustituyente R en la fracción de alcohol 4-aminobencílico (realización A-OH de A') es hidrógeno o un grupo alquilo seleccionado entre grupos alquilo C₁-C₁₀.



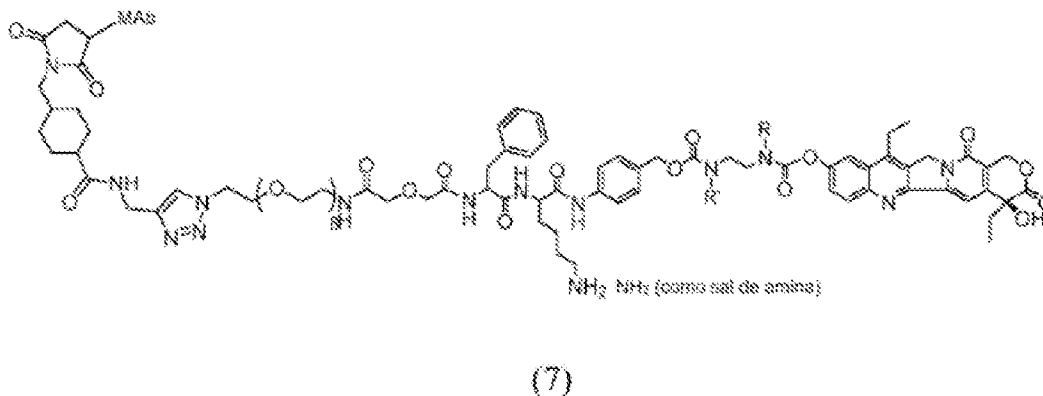
[0053] La invención es útil en la preparación de MAb-CLX-SN-38 de fórmula 5, en donde el aminoácido único AA es L-lisina y R = H, y el fármaco es SN-38 (fórmula 6; denominado MAb-CL2A-SN-38).



15 [0054] Otras formas de realización son posibles dentro del contexto de las camptotecinas que contienen 10-hidroxi, tales como SN-38. En el ejemplo de SN-38 como fármaco, el grupo 10-hidroxi más reactivo del fármaco se derivatiza dejando el grupo 20-hidroxilo inalterado. Dentro de la fórmula general 2, A' es una etilendiamina sustituida. Un ejemplo de esta forma de realización está representado por la fórmula '7' a continuación, en la que el grupo hidroxilo fenólico de SN-38 se derivatiza como un carbamato con una etilendiamina sustituida, con la otra amina de la diamina derivatizada como un carbamato con un alcohol 4-aminobencílico, y el grupo amino de este último está unido 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.

20

25

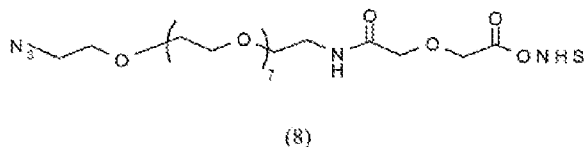


35

40 [0055] En una forma de realización, AA comprende una fracción polipeptídica, preferiblemente un di, tri o tetrapéptido, que es escindible por la peptidasa intracelular. Los ejemplos son: Ala-Leu, Leu-Ala-Leu y Ala-Leu-Ala-Leu (Trouet et al., 1982).

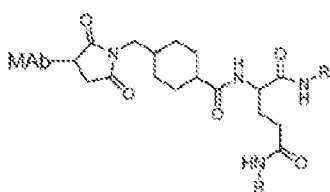
45 [0056] A veces, el componente L1 del conjugado contiene un espaciador de polietilenglicol (PEG) definido con 1-30 unidades monoméricas repetidas. A veces, el PEG es un PEG definido con 1-12 unidades monoméricas repetidas. La introducción de PEG puede implicar el uso de derivados de PEG heterobifuncionalizados que están disponibles comercialmente. El PEG heterobifuncional puede contener un grupo azida o acetileno. A continuación, en la fórmula 8, se proporciona un ejemplo de un PEG definido heterobifuncional que contiene 8 unidades monoméricas repetidas, donde "NHS" es succinimido:

50

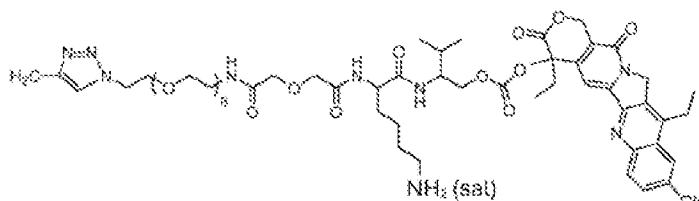


60 [0057] A veces, L2 tiene una pluralidad de grupos acetileno (o azida), que van desde 2-40, pero preferiblemente 2-20, y más preferiblemente 2-5, y una única fracción de unión al vector de direccionamiento.

65 [0058] A continuación se muestra un conjugado SN-38 representativo de un anticuerpo que contiene múltiples moléculas de fármaco y una única fracción de unión al vector de orientación. El componente 'L2' de esta estructura está unido a 2 grupos acetilénicos, lo que da como resultado la unión de dos moléculas SN-38 unidas con azida. La unión al MAb se representa como una succinimida.



Donde el residuo R es:



(9)

[0059] A veces, cuando el fármaco bifuncional contiene una fracción reactiva al tiol 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 anticuerpos mediante modificaciones de los grupos lisina del 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) puede generar de 7 a 10 tioles en el anticuerpo; que tiene la ventaja de incorporar múltiples fracciones de fármaco en la región entre cadenas del MAb lejos de la región de unión al antígeno.

[0060] A veces, la fracción quimioterapéutica se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina (DOX), epirrubicina, morfolinodoxorrubicina (morfolino-DOX), cianomorfolino-doxorrubicina (cianomorfolino-DOX), 2-pirrolino-doxorrubicina (2-PDOX), CPT, 10-hidroxi camptotecina, SN-38, topotecán, lurtotecán, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina, taxanos, geldanamicina, ansamicinas y epitolonas. En la presente invención, la fracción quimioterapéutica es SN-38. Preferiblemente, la fracción de direccionamiento se une a al menos una fracción quimioterapéutica; preferiblemente de 1 a aproximadamente 12 fracciones quimioterapéuticas; lo más preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 fracciones quimioterapéuticas.

[0061] El componente de enlace 'L2' puede comprender un grupo tiol que reacciona con un residuo reactivo al tiol introducido en uno o más grupos amino de la cadena lateral de lisina de dicha fracción de direccionamiento. En tales casos, el anticuerpo se derivatiza previamente con un grupo reactivo al tiol, tal como una maleimida, vinilsulfona, bromoacetamida o yodoacetamida mediante 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 enlaces de fármacos CPT en los que CPT tiene además un grupo 10-hidroxilo. Este proceso implica, pero no se limita a, la protección del grupo 10-hidroxilo como un derivado de *t*-butiloxicarbonilo (BOC), seguido de la preparación del penúltimo intermedio del conjugado de fármaco-enlazador. Normalmente, la eliminación del grupo BOC requiere un tratamiento con un ácido fuerte, tal como ácido trifluoroacético (TFA). En estas condiciones, el carbonato de enlace CPT 20-O, que contiene grupos protectores que deben eliminarse, también es susceptible de escisión, dando lugar así a CPT no modificado. De hecho, la razón para utilizar un grupo protector metoxitritilo (MMT) ligeramente eliminable para la cadena lateral de lisina de la molécula de enlace, como se enuncia en la técnica, fue 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 fue aquel en el que se eliminó el 'BOC' en la posición 10-hidroxilo, mientras que el carbonato en la posición '20' estaba intacto.

[0063] Un enfoque alternativo implica proteger la posición 10-hidroxi del análogo de CPT con un grupo distinto de 'BOC', de modo 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 mediante condiciones de pH fisiológico o mediante esterasas después de 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 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 de 10-hidroxi en SN-38 puede ser 'COR' donde R puede ser un alquilo sustituido tal como "N(CH₃)₂-(CH₂)_n-" donde n es 1-10 y en donde el grupo amino terminal está opcionalmente en forma de una sal cuaternaria para una solubilidad acuosa mejorada, o un residuo de alquilo simple tal como "CH₃-(CH₂)_n-" donde n es 0-10, o puede ser una fracción alcoxi tal como "CH₃-(CH₂)_n-O-" donde n es 0-10, o "N(CH₃)₂-(CH₂)_n-O-" donde n es 2-10, o "R₁O-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₂-CH₂-O-" donde R₁ es etilo o metilo y n es un número

entero con valores de 0-10. Estos derivados 10-hidroxi se preparan fácilmente mediante tratamiento con el cloroformiato del reactivo elegido, si el derivado final va a ser un carbonato. Normalmente, la camptotecina que contiene 10-hidroxi, como la SN-38, se trata con un equivalente molar del cloroformiato en dimetilformamida utilizando trietilamina como base. En estas condiciones, la posición 20-OH no se ve afectada. Para formar 10-O-ésteres, se utiliza el cloruro de ácido del reactivo elegido.

[0064] En un proceso de preparación de un conjugado de un derivado de fármaco y un anticuerpo de la fórmula general 2, en donde los descriptores L2, L1, AA y AX son como se describieron en secciones anteriores, primero se prepara la fracción de fármaco bifuncional, [L2]-[L1]-[AA]_m-[AX]-Fármaco, seguido por la conjugación de la fracción de fármaco bifuncional con la fracción de direccionamiento, TM.

[0065] En un proceso de preparación de un conjugado de un derivado de fármaco y un anticuerpo de la fórmula general 2, en donde los descriptores L2, L1, AA y A-OH son como se describieron en secciones anteriores, la fracción de fármaco bifuncional se prepara primero uniendo A-OH al extremo C de AA a través de un enlace amida, seguido por el acoplamiento del extremo amina de AA a un grupo de ácido carboxílico de L1. Si AA está ausente (es decir, m = 0), A-OH se une directamente a L1 a través de un enlace amida. El agente de reticulación, [L1]-[AA]_m-[A-OH], se une al grupo hidroxilo o amino del fármaco, y esto es seguido por la unión a la fracción L1, recurriendo a la reacción entre los grupos azida (o acetileno) y acetileno (o azida) en L1 y L2 a través de la química de clic.

[0066] En una forma de realización, la fracción de direccionamiento, TM, es un anticuerpo monoclonal (MAb). En una forma de realización adicional, la fracción de direccionamiento puede ser un MAb multivalente y/o multiespecífico. La fracción de direccionamiento puede ser un anticuerpo monoclonal murino, quimérico, humanizado o humano, y dicho anticuerpo puede estar en forma intacta, de fragmento (Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂) o de subfragmento (construcciones de cadena sencilla), o de un isotipo IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4, IgA, o submoléculas de los mismos.

[0067] En una forma de realización preferida, la fracción de direccionamiento es un anticuerpo monoclonal que es reactivo con un antígeno o epítipo de un antígeno expresado en una célula cancerosa o maligna. La célula cancerosa es preferiblemente una célula de un tumor hematopoyético, carcinoma, sarcoma, melanoma o un tumor glial. Una neoplasia maligna preferida a tratar según la presente invención es un tumor sólido maligno o una neoplasia hematopoyética.

[0068] En una forma de realización preferida, la fracción escindible intracelularmente puede escindirse después de que se internaliza en la célula tras la unión del conjugado MAb-fármaco a un receptor de la misma, y particularmente puede escindirse mediante esterasas y peptidasas.

[0069] La fracción de direccionamiento es preferiblemente un anticuerpo (incluyendo anticuerpos completamente humanos, no humanos, humanizados o quiméricos) o un fragmento de anticuerpo (incluyendo fragmentos producidos enzimáticamente o de manera recombinante) o proteínas de unión que incorporan secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos, fragmentos y proteínas de unión pueden ser multivalentes y multiespecíficos o multivalentes y monoespecíficos como se definió anteriormente.

Técnicas generales de anticuerpos

[0070] Las técnicas para preparar anticuerpos monoclonales contra prácticamente cualquier antígeno objetivo 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 comprende 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 producen anticuerpos contra el antígeno, cultivando los clones que producen anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridomas.

[0071] Los MAb pueden aislarse y purificarse a partir de cultivos de hibridomas mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y páginas 2.9.1-2.9.3. Véase también Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

[0072] Después de la producción inicial de anticuerpos contra el inmunógeno, los anticuerpos pueden secuenciarse y posteriormente prepararse mediante técnicas recombinantes. La humanización y quimerización de anticuerpos murinos y fragmentos de anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la materia, como se analiza a continuación.

[0073] El experto en la materia 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 de uso pueden obtenerse comercialmente de una amplia variedad de fuentes conocidas. Por ejemplo, una variedad de líneas de hibridoma secretoras de anticuerpos están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Una gran cantidad de anticuerpos contra diversos objetivos patológicos, incluidos, entre otros, antígenos asociados a tumores, se han depositado en la ATCC y/o se han publicado secuencias de región variable y están disponibles para su uso en los

métodos y composiciones reivindicados. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 7.312.318; 7.282.567; 7.151.164; 7.074.403; 7.060.802; 7.056.509; 7.049.060; 7.045.132; 7.041.803; 7.041.802; 7.041.293; 7.038.018; 7.037.498; 7.012.133; 7.001.598; 6.998.468; 6.994.976; 6.994.852; 6.989.241; 6.974.863; 6.965.018; 6.964.854; 6.962.981; 6.962.813; 6.956.107; 6.951.924; 6.949.244; 6.946.129; 6.943.020; 6.939.547; 6.921.645; 6.921.645; 5 6.921.533; 6.919.433; 6.919.078; 6.916.475; 6.905.681; 6.899.879; 6.893.625; 6.887.468; 6.887.466; 6.884.594; 6.881.405; 6.878.812; 6.875.580; 6.872.568; 6.867.006; 6.864.062; 6.861.511; 6.861.227; 6.861.226; 6.838.282; 6.835.549; 6.835.370; 6.824.780; 6.824.778; 6.812.206; 6.793.924; 6.783.758; 6.770.450; 6.767.711; 6.764.688; 6.764.681; 6.764.679; 6.743.898; 6.733.981; 6.730.307; 6.720.15; 6.716.966; 6.709.653; 6.693.176; 6.692.908; 6.689.607; 6.689.362; 6.689.355; 6.682.737; 6.682.736; 6.682.734; 6.673.344; 6.653.104; 6.652.852; 6.635.482; 6.630.144; 10 6.610.833; 6.610.294; 6.605.441; 6.605.279; 6.596.852; 6.592.868; 6.576.745; 6.572.856; 6.566.076; 6.562.618; 6.545.130; 6.544.749; 6.534.058; 6.528.625; 6.528.269; 6.521.227; 6.518.404; 6.511.665; 6.491.915; 6.488.930; 6.482.598; 6.482.408; 6.479.247; 6.468.531; 6.468.529; 6.465.173; 6.461.823; 6.458.356; 6.455.044; 6.455.040. 6.451.310; 6.444.206; 6.441.143; 6.432.404; 6.432.402; 6.419.928; 6.413.726; 6.406.694; 6.403.770; 6.403.091; 6.395.276; 6.395.274; 6.387.350; 6.383.759; 6.383.484; 6.376.654; 6.372.215; 6.359.126; 6.355.481; 6.355.444; 15 6.355.245; 6.355.244; 6.346.246; 6.344.198; 6.340.571; 6.340.459; 6.331.175; 6.306.393; 6.254.868; 6.187.287; 6.183.744; 6.129.914; 6.120.767; 6.096.289; 6.077.499; 5.922.302; 5.874.540; 5.814.440; 5.798.229; 5.789.554; 5.776.456; 5.736.119; 5.716.595; 5.677.136; 5.587.459; 5.443.953. 5.525.338. Estos son solo ejemplos y se conocen en la técnica una amplia variedad de otros anticuerpos y sus hibridomas. El experto en la materia se dará cuenta de que las secuencias de anticuerpos o los hibridomas secretores de anticuerpos contra casi cualquier antígeno asociado a una enfermedad se pueden obtener mediante una simple búsqueda en las bases de datos ATCC, NCBI y/o USPTO de anticuerpos contra un objetivo de interés asociado a una enfermedad seleccionado. Los dominios de unión a antígeno de los anticuerpos clonados se pueden amplificar, escindir, ligar en un vector de expresión, transfectar en una célula huésped adaptada y utilizar para la producción de proteínas, utilizando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Los anticuerpos aislados se pueden conjugar con agentes terapéuticos, como camptotecinas, utilizando las técnicas descritas en el presente documento.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

[0074] Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante en la que las regiones variables de un anticuerpo humano se han reemplazado por las regiones variables de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, incluidas las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo de ratón. Los anticuerpos quiméricos muestran una inmunogenicidad reducida y una estabilidad aumentada cuando se administran a un sujeto. Los métodos para construir anticuerpos quiméricos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Leung et al., 1994, *Hybridoma* 13:469).

[0075] Un anticuerpo monoclonal quimérico puede humanizarse transfiriendo las CDR de ratón de las cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a los dominios variables correspondientes de un anticuerpo humano. Las regiones de estructura de ratón (FR) en el anticuerpo monoclonal quimérico también se reemplazan con secuencias FR humanas. Para preservar la estabilidad y la especificidad antigénica del anticuerpo monoclonal humanizado, uno o más residuos de FR humanos pueden reemplazarse por los residuos homólogos de ratón. Los anticuerpos monoclonales humanizados pueden usarse para el tratamiento terapéutico de sujetos. Las técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales humanizados son bien conocidas en la técnica. (Véase, por ejemplo, Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323; Verhoeven et al., 1988, *Science*, 239:1534; Carter et al., 1992, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:4285; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.*, 1992, 12:437; Tempest et al., 1991, *Biotechnology* 9:266; Singer et al., *J. Immunol.*, 1993, 150:2844.).

[0076] Otras formas de realización pueden referirse a anticuerpos de primates no humanos. Se pueden encontrar técnicas generales para generar 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 forma de realización, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos se pueden obtener a partir de ratones transgénicos que han sido modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición antigénica, como se analiza a continuación.

Anticuerpos humanos

[0077] Los métodos para producir anticuerpos completamente humanos utilizando enfoques combinatorios o animales transgénicos transformados con loci de inmunoglobulina humana son conocidos en la técnica (por ejemplo, Mancini et al., 2004, *New Microbiol.* 27:315-28; Conrad y Scheller, 2005, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:117-26; Brekke y Loset, 2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50). Se espera que dichos anticuerpos completamente humanos presenten incluso menos efectos secundarios que los anticuerpos quiméricos o humanizados y que funcionen *in vivo* como anticuerpos humanos esencialmente endógenos. Los métodos y procedimientos pueden utilizar anticuerpos humanos producidos por dichas técnicas.

[0078] En una alternativa, la técnica de presentación en fagos 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 presentan un estado patológico particular, como el cáncer (Dantas-

Barbosa et al., 2005). La ventaja de construir anticuerpos humanos a partir de un individuo enfermo es que el repertorio de anticuerpos circulantes puede estar sesgado hacia los anticuerpos contra antígenos asociados a la enfermedad.

5 **[0079]** En un ejemplo no limitante de esta metodología, Dantas-Barbosa et al. (2005) construyeron una biblioteca de presentación en fagos de fragmentos de anticuerpos Fab humanos de pacientes con osteosarcoma. Generalmente, el ARN total se obtuvo de linfocitos sanguíneos circulantes (*Id.*). Los Fab recombinantes se clonaron a partir de los repertorios de anticuerpos de cadena μ , γ y κ y se insertaron en una biblioteca de presentación en fagos (*Id.*). Los ARN se convirtieron en ADNc y se usaron para crear bibliotecas de ADNc Fab usando cebadores específicos contra las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera (Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97). La construcción de la biblioteca se realizó de acuerdo con Andris-Widhopf et al. (2000, en: *Phage Display Laboratory Manual*, Barbos et al. (eds), 1.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 9.1 a 9.22). Los fragmentos Fab finales se digirieron con endonucleasas de restricción y se insertaron en el genoma del bacteriófago para crear la biblioteca de visualización de fagos. Dichas bibliotecas se pueden analizar mediante métodos de visualización de fagos estándar. El experto en la materia comprenderá que esta técnica es solo a modo de ejemplo y que se puede utilizar cualquier método conocido para producir y analizar anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos mediante visualización de fagos.

20 **[0080]** En otra alternativa, los animales transgénicos que han sido modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos pueden usarse para generar anticuerpos contra esencialmente cualquier diana inmunogénica, usando protocolos de inmunización estándar como los discutidos anteriormente. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos están descritos por Green et al., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg et al., *Nature* 368:856 (1994), y Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579 (1994). Un ejemplo no limitante de un sistema de este tipo es el XenoMouse® (por ejemplo, Green et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23) de Abgenix (Fremont, CA). En el XenoMouse® y animales similares, los genes de anticuerpos de ratón han sido inactivados y reemplazados por genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que el resto del sistema inmunológico del ratón permanece intacto.

30 **[0081]** El XenoMouse® se transformó con YAC configurados por línea germinal (cromosomas artificiales de levadura) que contenían porciones de los loci humanos IgH e Ig kappa, incluyendo la mayoría de las secuencias de la región variable, junto con genes accesorios y secuencias reguladoras. El repertorio de la región variable humana se puede utilizar para generar células B productoras de anticuerpos, que se pueden procesar en hibridomas mediante técnicas conocidas. Un XenoMouse® inmunizado con un antígeno diana producirá anticuerpos humanos mediante la respuesta inmunitaria normal, que se pueden recolectar y/o producir mediante las técnicas estándar descritas anteriormente. Hay disponible una variedad de cepas de XenoMouse®, cada una de las cuales es capaz de producir una clase diferente de anticuerpo. 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 en la materia se dará cuenta de que las composiciones y los 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 pueden referirse a fragmentos de anticuerpos. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirarse adicionalmente utilizando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Alternativamente, una escisión enzimática utilizando pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc. Se describen métodos ejemplares para producir fragmentos de anticuerpos en la Patente de EE. UU. N.º 4.036.945; la Patente de EE. UU. N.º 4.331.647; Nisonoff et al., 1960, *Arch. Otros métodos de escisión de anticuerpos*, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas también pueden utilizarse, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

55 **[0083]** 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. EE. UU.*, 69:2659. Alternativamente, las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas por sustancias químicas 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 enlace peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena única (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 de enlace de oligonucleótidos. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que posteriormente se introduce en una célula huésped, tal como E. coli. Las células huésped recombinantes sintetizan una cadena polipeptídica única con un péptido enlace que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFv 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.

[0085] Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de dominio único (dAb), a veces 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 anticuerpo pueden comprender una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") pueden obtenerse mediante la construcción de genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del 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

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

Anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos

[0087] Los anticuerpos biespecíficos son útiles en varias aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico con sitios de unión para un antígeno de superficie de célula tumoral y para un receptor de superficie de célula T puede dirigir la lisis de células tumorales específicas por células T. Los anticuerpos biespecíficos que reconocen gliomas y el epítipo CD3 en 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 divulgadas en este documento se pueden utilizar con anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos como fracciones de orientación.

[0088] Se conocen numerosos métodos para producir anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7.405.320. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante el método de cuadro, que implica la fusión de dos hibridomas diferentes, cada uno de los cuales produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio antigénico diferente (Milstein y Cuello, Nature, 1983; 305:537-540).

[0089] Otro método para producir anticuerpos biespecíficos utiliza reticuladores heterobifuncionales para unir químicamente dos anticuerpos monoclonales diferentes (Staerz, et al. Nature. 1985; 314:628-631; Perez, et al. Nature. 1985; 316:354-356); 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 semimoléculas, 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 implica la reticulación química de dos o tres fragmentos Fab' purificados por separado utilizando los ligadores apropiados (Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea 0453082).

[0090] Otros métodos incluyen mejorar la eficiencia de generar hibridomas híbridos mediante transferencia génica de marcadores seleccionables distintos a través de vectores lanzadera derivados de retrovirus en 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 contienen los genes de cadena pesada y ligera de un anticuerpo diferente.

[0091] Los dominios V_H y V_L cognados se pueden unir con un enlazador peptídico de composición y longitud apropiadas (que normalmente consiste en más de 12 residuos de aminoácidos) para formar un Fv de cadena sencilla (scFv) con actividad de unión. Los métodos de fabricación de scFv se describen en la Patente de EE.UU. N.º 4.946.778 y la 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 como resultado la formación de multímeros funcionales. Las cadenas polipeptídicas de los dominios V_H y V_L que se unen con enlaces entre 3 y 12 residuos de aminoácidos forman predominantemente dímeros (denominados diacuerpos). Con enlaces entre 0 y 2 residuos de aminoácidos, se favorecen los trímeros (denominados triacuerpos) y los tetrámeros (denominados tetracuerpos), pero los patrones exactos de

oligomerización parecen depender de la composición y la orientación de los dominios V (V_H -enlazador- V_L o V_L -enlazador- V_H), además de la longitud del enlace.

5 **[0092]** Estas técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos presentan diversas dificultades en términos de bajo rendimiento, necesidad de purificación, baja estabilidad o la intensidad de mano de obra 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, las patentes de EE. UU. números 7.550.143; 7.521.056; 7.534.866; 7.527.787 y USSN 11/925.408). La técnica utiliza dominios de unión a proteínas complementarios, denominados dominios de anclaje (DA) y dominios de dimerización y acoplamiento (DDA), que se unen entre sí y permiten el ensamblaje de estructuras complejas, que van desde dímeros, 10 trímeros, tetrámeros, quintámeros y hexámeros. Estos forman complejos estables con alto rendimiento sin necesidad de una purificación extensa. La técnica DNL permite el ensamblaje de anticuerpos mono-específicos, biespecíficos o multiespecíficos. Cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica para la elaboración de anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos puede utilizarse en la práctica de los métodos reivindicados en la presente memoria.

15 **[0093]** En diversas formas de realización, un conjugado como se describe en el presente documento puede ser parte de un anticuerpo multiespecífico compuesto. Dichos anticuerpos pueden contener dos o más sitios de unión a antígeno diferentes, con diferentes especificidades. El compuesto multiespecífico puede unirse a diferentes epítopos del mismo antígeno o, alternativamente, puede unirse a dos antígenos diferentes. Algunas de las combinaciones de dianas más preferidas incluyen las que se enumeran en la Tabla 1. Esta es una lista de ejemplos de combinaciones preferidas, pero no pretende ser exhaustiva.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 1. Algunos ejemplos de anticuerpos multiespecíficos.

	Primer objetivo	Segundo objetivo
5	MIF	Una segunda citocina efectora proinflamatoria, especialmente HMGB-1, TNF- α , IL-1 o IL-6
	MIF	Quimiocina efectora proinflamatoria, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
10	MIF	Receptor efector proinflamatorio, especialmente IL-6R, IL-13R e IL-15R
	MIF	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
	MIF	Factor de complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
15	MIF	Proteína reguladora del complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
	MIF	Antígeno o receptor asociado al cáncer
	HMGB-1	Una segunda citocina efectora proinflamatoria, especialmente MIF, TNF- α , IL-1 o IL-6
20	HMGB-1	Quimiocina efectora proinflamatoria, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
	HMGB-1	Receptor efector proinflamatorio, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
	HMGB-1	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
25	HMGB-1	Factor de 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
30	TNF- α	Una segunda citocina efectora proinflamatoria, especialmente MIF, HMGB-1, TNF- α , IL-1 o IL-6
	TNF- α	Quimiocina efectora proinflamatoria, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
35	TNF- α	Receptor efector proinflamatorio, especialmente IL-6R, IL-13R y IL-15R
	TNF- α	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
	TNF- α	Factor de complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
40	TNF- α	Proteína reguladora del complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
	TNF- α	Antígeno o receptor asociado al cáncer
45	LPS	Citocina efectora proinflamatoria, especialmente MIF, HMGB-1, TNF- α , IL-1 o IL-6
	LPS	Quimiocina efectora proinflamatoria, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
	LPS	Receptor efector proinflamatorio, especialmente IL-6R, IL-13R y IL-15R
50	LPS	Factor de coagulación, especialmente TF o trombina
	LPS	Factor de complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
	LPS	Proteína reguladora del complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
55	TF o trombina	Citocina efectora proinflamatoria, especialmente MIF, HMGB-1, TNF- α , IL-1 o IL-6
	TF o trombina	Quimiocina efectora proinflamatoria, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A o MIP-1B
	TF o trombina	Receptor efector proinflamatorio, especialmente IL-6R, IL-13R y IL-15R
60	TF o trombina	Factor de complemento, especialmente C3, C5, C3a o C5a
	TF o trombina	Proteína reguladora del complemento, especialmente CD46, CD55, CD59 y mCRP
65	TF o trombina	Antígeno o receptor asociado al cáncer

[0094] Otras combinaciones más, como las que se prefieren para terapias contra el cáncer, incluyen anticuerpos CD20 + CD22, anticuerpos CD74 + CD20, anticuerpos CD74 + CD22, anticuerpos CEACAM5 (CEA) + CEACAM6 (NCA), anticuerpos contra el factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF) + CEACAM5, anticuerpos EGP-1 (por ejemplo, RS-7) + ILGF, anticuerpos CEACAM5 + EGFR. Dichos anticuerpos no solo necesitan usarse en combinación, sino que pueden combinarse como proteínas de fusión de diversas formas, como IgG, Fab, scFv y similares, como se describe en las Patentes de EE. UU. N.º 6.083.477; 6.183.744 y 6.962.702 y las Publicaciones de Solicitudes de Patente de EE. UU. N.º 20030124058; 20030219433; 20040001825; 20040202666; 20040219156; 20040219203; 20040235065; 20050002945; 20050014207; 20050025709; 20050079184; 20050169926; 20050175582; 20050249738; 20060014245 y 20060034759.

Antígenos diana y anticuerpos ejemplares

[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 en niveles elevados en células diana y que se expresan predominantemente o solo en células enfermas frente a tejidos normales, y anticuerpos que se internalizan rápidamente. Los anticuerpos que son útiles incluyen MAbs con propiedades como las descritas anteriormente (y muestran propiedades distintivas de diferentes niveles de internalización en células y microorganismos), y contemplan el uso de, pero no se limitan a, en cáncer, los siguientes MAbs: LL1 (anti-CD74), LL2 y RFB4 (anti-CD22), RS7 (anti-glicoproteína-1 epitelial (EGP-1)), PAM4 y KC4 (ambos anti-mucina), MN-14 (antígeno anti-carcinoembrionario (CEA, también conocido como CD66e), Mu-9 (antígeno anti-colon-específico-p), Immu 31 (un anti-alfa-fetoproteína), TAG-72 (p. ej., CC49), Tn, J591 o HuJ591 (anti-PSMA (antígeno de membrana específico de próstata)), AB-PG1-XG1-026 (dímero anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (un MAb anti-anhidrasa carbónica IX) y hL243 (anti-HLA-DR). Dichos anticuerpos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Patentes de EE. UU. 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 la Solicitud de patente publ. n.º 20040185053; 20040202666; 20050271671; 20060193865; 20060210475; 20070087001). Los anticuerpos específicos conocidos de uso incluyen hPAM4 (Patente de EE. UU. N.º 7.282.567), hA20 (Patente de EE. UU. N.º 7.251.164), hA19 (Patente de EE. UU. N.º 7.109.304), hIMMU31 (Patente de EE. UU. N.º 7.300.655), hLL1 (Patente de EE. UU. N.º 7.312.318), hLL2 (Patente de EE. UU. N.º 7.074.403), hMu-9 (Patente de EE. UU. N.º 7.387.773), hL243 (Patente de EE. UU. N.º 7.612.180), hMN-14 (Patente de EE. UU. N.º 6.676.924), hMN-15 (Patente de EE. UU. N.º 7.541.440), hR1 (Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. 61/145,896), hRS7 (Patente de EE. UU. N.º 7,238,785), hMN-3 (Patente de EE. UU. N.º 7,541,440), AB-PG1-XG1-026 (Solicitud de Patente de EE. UU. 11/983,372, depositada como ATCC PTA-4405 y PTA-4406) y D2/B (WO 2009/130575).

[0096] Otros antígenos útiles que pueden ser seleccionados como objetivo utilizando los conjugados descritos incluyen anhidrasa carbónica IX, B7, CCCL19, CCCL21, CSAP, HER-2/neu, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20 (por ejemplo, MAbs C2B8, hA20, 1F5), 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 (p. ej., AVASTIN®, variante de empalme de fibronectina), fibronectina ED-B (p. ej., L19), EGP-1, EGP-2 (p. ej., 17-1A), receptor de 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 de 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 oncogén.

[0097] Los antígenos CD66 consisten en cinco glicoproteínas diferentes con estructuras similares, CD66a-e, codificadas por los miembros de la familia de genes del antígeno carcinoembrionario (CEA), BCG, CGM6, NCA, CGM1 y CEA, respectivamente. Estos antígenos CD66 (por ejemplo, CEACAM6) se expresan principalmente en granulocitos, células epiteliales normales del tracto digestivo y células tumorales de diversos tejidos. También se incluyen como objetivos adecuados para los cánceres los antígenos del cáncer de testículo, 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 mencionados anteriormente se describen en la solicitud provisional estadounidense número de serie 60/426.379, titulada "Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics", presentada el 15 de noviembre de 2002. Las células madre cancerosas, a las que se les atribuye ser poblaciones de células malignas precursoras más resistentes a la terapia (Gan, J Cell Mol. Med. 5 de diciembre de 2007 [publicación electrónica antes de la impresión]; Hill y Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99(19):1435-40), tienen antígenos que pueden ser el objetivo en ciertos tipos de cáncer, como CD133 en el cáncer de próstata (Maitland et al., Ernst Schering Found. Sympos. Proc. 2006; 5:155-79), cáncer de pulmón de células no pequeñas (Donnenberg et al., J. Control Release 2007; 122(3):385-91) y glioblastoma (Beier et al., Cancer Res. 2007; 67(9):4010-5), y CD44 en cáncer colorrectal (Dalerba et al., Proc. Natl. Acad.

Sci. EE. UU. 2007; 104(24):10158-63), cáncer de páncreas (Li et al., *Cancer Res.* 2007; 67(3):1030-7), y en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Prince et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 2007; 104(3):973-8).

5 **[0098]** En la terapia del mieloma múltiple, se han descrito anticuerpos de focalización 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; 9 de octubre (publicación electrónica antes de la impresión) y CD40 (Tai et al., 2005; *Cancer Res.* 65(13):5898-5906).

10 **[0099]** Un análisis exhaustivo reciente de objetivos de antígenos adecuados (Designación de Clúster, o DC) en células malignas hematopoyéticas, como se muestra por citometría de flujo y que puede ser una guía para seleccionar anticuerpos adecuados para inmunoterapia conjugada con fármacos, es Craig y Foon, *Blood* prepublicado en línea el 15 de enero de 2008; DOL 10.1182/blood-2007-11-120535.

15 **[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 y acumulación continuas del conjugado circulante por la célula. Un ejemplo de un par anticuerpo/antígeno más preferido es LL1, un MAb anti-CD74 (cadena invariante, chaperona específica de clase II, li) (véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.º 6.653.104; 7.312.318). El antígeno CD74 se expresa en gran medida en linfomas de células B (incluido el mieloma múltiple) y leucemias, ciertos linfomas de células T, melanomas, cánceres colónicos, pulmonares y renales, 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 está contenida en Stein et al., *Clin Cancer Res.* 2007 Sep 15;13(18 Pt 2):5556s-5563s.

25 **[0101]** Las enfermedades que se tratan preferiblemente con anticuerpos anti-CD74 incluyen, pero no se limitan a, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, melanoma, cánceres de pulmón, renales y colónicos, glioblastoma multiforme, histiocitomas, leucemias mieloides y mieloma múltiple. La expresión continua del antígeno CD74 durante períodos cortos de tiempo en la superficie de las células diana, seguida de la internalización del antígeno y la reexpresión del antígeno, permite que el anticuerpo LL1 de destino se internalice junto con cualquier fracción quimioterapéutica que contenga. Esto permite que se acumule una concentración alta y terapéutica de conjugado de fármaco quimioterapéutico-LL1 dentro de dichas células. Los conjugados de fármaco quimioterapéutico-LL1 internalizados se reciclan a través de lisosomas y endosomas, y la fracción quimioterapéutica se libera en una forma activa dentro de las células diana.

Dock-and-Lock (DNL)

35 **[0102]** En ciertas formas de realización preferidas, se pueden producir anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos utilizando la tecnología dock-and-lock (ver, por ejemplo, Patentes de EE. UU. N.ºs. 7,521,056; 7,550,143; 7,534,866; 7,527,787 y Solicitud de Patente de EE. UU. N.º. 11/925,408). El método DNL explota interacciones proteína/proteína específicas que ocurren entre las subunidades reguladoras (R) de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y el dominio de anclaje (DA) de las proteínas de anclaje de la quinasa A (AKAP) (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 una forma inactiva por las subunidades R (Taylor, *J. Biol. Chem.* 1989;264:8443). Las isoenzimas 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 se han aislado únicamente como dímeros estables y se ha demostrado que el dominio de dimerización consta de los primeros 44 residuos amino-terminales (Newlon et al., *Nat. Struct. Biol.* 1999; 6:222). La unión de AMPc a las subunidades R conduce a la liberación de subunidades catalíticas activas para un amplio espectro de actividades de serina/treonina quinasa, que están orientadas hacia sustratos seleccionados a través de la compartimentación de PKA mediante su acoplamiento con AKAP (Scott et al., *J. Biol. Chem.* 1990;265;21561).

55 **[0103]** Desde que se caracterizó la primera AKAP, proteína asociada a microtúbulos 2, en 1984 (Lohmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984;81:6723), se han identificado más de 50 AKAP que se localizan en varios sitios subcelulares, incluyendo la membrana plasmática, el citoesqueleto de actina, el núcleo, las mitocondrias y el retículo endoplásmico, con diversas estructuras en especies que van desde la levadura hasta los seres humanos (Wong y Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5:959). La DA de las AKAP para PKA es una hélice anfipática de 14-18 residuos (Carr et al., *J. Biol. Chem.* 1991;266:14188). Las secuencias de aminoácidos de la DA varían bastante entre los AKAP individuales, y las afinidades de unión informadas para los dímeros RII varían de 2 a 90 nM (Alto et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100:4445). Curiosamente, las AKAP solo se unirán a las subunidades R dimerizadas. En el caso de la RII α humana, la DA se une a una superficie hidrofóbica formada por los 23 residuos amino-terminales (Colledge y Scott, *Trends Cell Biol.* 1999; 6:216). Por lo tanto, el dominio de dimerización y el dominio de unión de AKAP del RII α humano están ubicados dentro de la misma secuencia de 44 aminoácidos N-terminal (Newlon et al., *Nat. Struct. Biol.* 1999;6:222; Newlon et al., *EMBO J.* 2001;20:1651), que en este documento se denomina DDA.

65 **[0104]** Hemos desarrollado una tecnología de plataforma para utilizar el DDA de RII α humano y el DA de una determinada secuencia de aminoácidos como un excelente par de módulos de enlace para acoplar dos entidades cualesquiera,

denominadas de aquí en adelante **A** y **B**, en un complejo no covalente, que podría bloquearse además en una estructura anclada de forma estable mediante la introducción de residuos de cisteína tanto en el DDA como en el DA en posiciones estratégicas para facilitar la formación de enlaces disulfuro. La metodología general del enfoque de "acoplamiento y bloqueo" es la siguiente. La entidad **A** se construye uniendo una secuencia DDA a un precursor de **A**, lo que da como resultado un primer componente denominado de aquí en adelante **a**. Debido a que la secuencia DDA efectuaría la formación espontánea de un dímero, **A** estaría compuesto de **a₂**. La entidad **B** se construye uniendo una secuencia DA a un precursor de **B**, lo que da como resultado un segundo componente denominado de aquí en adelante **b**. El motivo dimérico de DDA contenido en **a₂** creará un sitio de acoplamiento para la unión a la secuencia DA contenida en **b**, facilitando así una asociación rápida de **a₂** y **b** para formar un complejo trimérico binario compuesto de **a₂b**. Este evento de unión se vuelve irreversible con una reacción posterior para asegurar covalentemente las dos entidades a través de puentes disulfuro, lo que ocurre de manera muy eficiente según el principio de concentración local efectiva porque las interacciones de unión iniciales deberían acercar los grupos tiol reactivos colocados tanto en DDA como en DA (Chimura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001;98:8480) para ligarse de manera específica en el sitio.

[0105] Al unir el DDA y el DA lejos de los grupos funcionales de los dos precursores, también se espera que dichas ligaduras específicas del sitio conserven las actividades originales de los dos precursores. Este enfoque es de naturaleza modular y potencialmente se puede aplicar para unir, de manera específica del sitio y de manera covalente, una amplia gama de sustancias, incluidos péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras fracciones efectoras con una amplia gama de actividades. Utilizando el método de proteína de fusión para construir efectores conjugados con DA y DDA, prácticamente cualquier proteína o péptido se puede incorporar en una construcción de DNL. Sin embargo, la técnica no es limitante y se pueden utilizar otros métodos de conjugación.

[0106] Se conocen diversos métodos para elaborar proteínas de fusión, entre ellos la síntesis, hibridación y/o amplificación de ácidos nucleicos para producir un ácido nucleico bicatenario sintético que codifique 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 de biología molecular estándar (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory manual, 2.^a edición, 1989). En dichas formas de realización preferidas, la fracción DA y/o DDA puede unirse al extremo N-terminal o C-terminal de una proteína o péptido efector, tal como un anticuerpo o fragmento. Sin embargo, el experto en la materia se dará cuenta de que el sitio de unión de una fracción DA o DDA 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 en su actividad fisiológica. La unión específica del sitio de una variedad de fracciones efectoras se puede realizar utilizando técnicas conocidas en la técnica, como el uso de reactivos de reticulación bivalente y/u otras técnicas de conjugación química.

[0107] En una forma de realización preferida, las proteínas de fusión se ensamblan mediante las técnicas de acoplamiento y bloqueo (DNL) divulgadas, por ejemplo, en Rossi EA, et al., Proc Natl Acad Sci. EE. UU. 2006; 103:6841-6846; Patentes de EE. UU. N.º 7.521.056; 7.550.143; 7.534.866; 7.527.787 y Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 11/925.408. A continuación, se divulgan secuencias DDA y DA ejemplares que se pueden utilizar en el método DNL para formar complejos sintéticos.

DDA1
SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)
DDA2
CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:2)
DA1
QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)
DA2
CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO:4)

50 *Variantes de secuencia de DNL*

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

[0109] Por ejemplo, Kinderman et al. (2006) examinaron la estructura cristalina de la interacción de unión DA-DDA y concluyeron que la secuencia DDA humana contenía una cantidad de residuos de aminoácidos conservados que eran importantes tanto en la formación del dímero como en la unión de AKAP, subrayados en SEQ ID NO:1 a continuación. (Véase la Figura 1 de Kinderman et al., 2006). El experto en la materia se dará cuenta de que al diseñar variantes de secuencia de la secuencia DDA, sería deseable evitar cambiar cualquiera de los residuos subrayados, mientras que se podrían realizar sustituciones de aminoácidos conservadoras para residuos que son menos críticos para la dimerización y la unión de AKAP.

*Secuencia DDA humana de la proteína quinasa A*SHIQIPPGITELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 1).

5 **[0110]** Alto et al. (2003) realizaron un análisis bioinformático de la secuencia DA de varias proteínas AKAP para diseñar una secuencia DA selectiva de RII denominada AKAP-IS (SEQ ID NO:5), con una constante de unión para DDA de 0,4 nM. La secuencia AKAP-IS se diseñó como un antagonista peptídico de la unión de AKAP a PKA. Los residuos en la secuencia AKAP-IS donde las sustituciones tendían a disminuir la unión a DDA están subrayados en SEQ ID NO:3.

*SECUENCIA AKAP-IS*10 QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3).

15 **[0111]** De manera similar, Gold (2006) utilizó cristalografía y cribado de péptidos para desarrollar una secuencia SuperAKAP-IS (SEQ ID NO:5), que exhibe una selectividad cinco órdenes de magnitud mayor para la isoforma RII de 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 porción DDA de RII α . En esta secuencia, el residuo Q N-terminal está numerado como residuo número 4 y el residuo A C-terminal es residuo número 20. Los residuos en los que se podrían realizar sustituciones para afectar la afinidad por RII α fueron los residuos 8, 11, 15, 16, 18, 19 y 20 (Gold et al., 2006). Se contempla que, en ciertas formas de realización alternativas, la secuencia SuperAKAP-IS puede sustituirse por la secuencia de la porción DA de AKAP-IS para preparar construcciones DNL. Otras secuencias alternativas que podrían sustituirse por la secuencia DA de AKAP-IS se muestran en SEQ ID NO:6-8. Las sustituciones relativas a la secuencia AKAP-IS están subrayadas. Se anticipa que, al igual que con la secuencia AKAP-IS (SEQ ID NO:3), el resto DA también puede incluir los residuos N-terminales cisteína y glicina adicionales y los residuos C-terminales glicina y cisteína, como se muestra en SEQ ID NO:4.

25 *SuperAKAP-IS*QIEYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID NO:5)*Secuencias AKAP alternativas*30 QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:6)QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:7)QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:8)

35 **[0112]** Stokka et al. (2006) también desarrollaron péptidos competidores de la unión de AKAP a PKA, mostrados en SEQ ID NO:9-11. Los antagonistas peptídicos se designaron como Ht31 (SEQ ID NO:9), RIAD (SEQ ID NO:10) y PV-38 (SEQ ID NO:11). El péptido Ht-31 exhibió una mayor afinidad por la isoforma RII de PKA, mientras que RIAD y PV-38 mostraron una mayor afinidad por RI.

40 *Ht31*

DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO:9)

RIAD

LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO:10)

PV-38

FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO:11)

45 **[0113]** Hundsrucker et al. (2006) desarrollaron otros competidores peptídicos para la unión de AKAP a PKA, con una constante de unión tan baja como 0,4 nM a la DDA de la forma RII de PKA. Las secuencias de varios péptidos antagonistas de AKAP se proporcionan en la Tabla 1 de Hundsrucker et al. Los residuos que se conservaron en gran medida entre los dominios DA de diferentes proteínas AKAP se indican a continuación subrayando 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 la FIG. 4 de Hundsrucker et al. (2006)). Las secuencias de antagonistas de péptidos con afinidades particularmente altas para la secuencia RII DDA se muestran en SEQ ID NO:12-14.

55 *AKAP-IS*QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)*AKAP7 δ -wt-pep*

PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:12)

AKAP7 δ -L304T-pep

PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:13)

60 *AKAP7 δ -L308D-pep*

PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:14)

65 **[0114]** Carr et al. (2001) examinaron el grado de homología de secuencia entre diferentes secuencias de DDA de unión a AKAP de proteínas humanas y no humanas e identificaron residuos en las secuencias de DDA que parecían ser los más altamente conservados entre diferentes fracciones de DDA. Estos se indican a continuación subrayando con referencia a la secuencia de DDA de PKA RII α humana de SEQ ID NO:1. Los residuos que se conservaron particularmente

se indican además en cursiva. Los residuos se superponen con, pero no son idénticos a los sugeridos por Kinderman et al. (2006) como importantes para la unión a las proteínas AKAP.

SHIQ/PPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1).

5 **[0115]** El experto en la materia se dará cuenta de que, en general, aquellos residuos de aminoácidos que están altamente conservados en las secuencias DDA y DA de diferentes proteínas son aquellos que puede preferirse que permanezcan constantes al realizar sustituciones de aminoácidos, mientras que los residuos que están menos altamente conservados pueden variarse más fácilmente para producir variantes de secuencia de las secuencias DA y/o DDA descritas en este documento.

10

Sustituciones de aminoácidos

15 **[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 DDA y/o DA utilizadas para crear construcciones DNL pueden modificarse como se explicó anteriormente.

20 **[0117]** El experto en la materia sabrá que, en general, las sustituciones de aminoácidos implican típicamente el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido de propiedades relativamente similares (es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras). Las propiedades de los diversos aminoácidos y el efecto de la sustitución de aminoácidos sobre la estructura y función de las proteínas han sido objeto de un amplio estudio y conocimiento en la técnica.

25 **[0118]** Por ejemplo, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos (Kyte y 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 base a sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte y 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 realizar sustituciones conservadoras, se prefiere el uso de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén dentro de ± 2 , son más preferidos los de ± 1 y son aún más preferidos los de $\pm 0,5$.

35 **[0119]** La sustitución de aminoácidos también puede tener en cuenta la hidrofiliidad del residuo de aminoácido (p. ej., Patente de EE. UU. N.º 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.

40 **[0120]** Otras consideraciones incluyen el tamaño de la cadena lateral de aminoácidos. Por ejemplo, generalmente no sería preferible reemplazar un aminoácido con una cadena lateral compacta, como glicina o serina, con un aminoácido con una cadena lateral voluminosa de átomos de carbono, por ejemplo, triptófano o tirosina. El efecto de varios residuos de aminoácidos sobre la estructura secundaria de la proteína también es una consideración. A través de un estudio empírico, se ha determinado el efecto de diferentes residuos de aminoácidos sobre la tendencia de los dominios de la proteína a adoptar una estructura secundaria de hélice alfa, hoja beta o giro inverso y es conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Chou y Fasman, 1974, Biochemistry, 13:222-245; 1978, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276; 1979, Biophys. J., 26:367-384).

45 **[0121]** Basándose en dichas consideraciones y en un amplio estudio empírico, se han construido tablas de sustituciones de aminoácidos conservativas 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.

55

60 **[0122]** Otras consideraciones para las sustituciones de aminoácidos incluyen si el residuo está ubicado en el interior de una proteína o si está expuesto al solvente. Para 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 de PROWL en rockefeller.edu) Para residuos expuestos al solvente, 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, tales como la matriz de puntuación PAM250, la matriz de Dayhoff, la matriz de Grantham, la matriz de McLachlan, la matriz de Doolittle, la matriz de Henikoff, la matriz de Miyata, la matriz de Fitch, la matriz de Jones, la matriz de Rao, la matriz de Levin y la matriz de Risler (*Idem.*).

65

[0123] Al determinar las sustituciones de aminoácidos, también se puede considerar la existencia de enlaces intermoleculares o intramoleculares, tales 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 experto en la materia, por ejemplo, mediante la técnica de mutagénesis dirigida al sitio o mediante síntesis y ensamblaje de oligonucleótidos que codifican una sustitución de aminoácidos y empalme en una construcción de vector de expresión.

Avímeros

[0125] En ciertas formas de realización, las fracciones de unión descritas en el presente documento pueden comprender una o más secuencias de avímeros. Los avímeros son una clase de proteínas de unión algo similares a los anticuerpos en sus afinidades y especificidades para varias moléculas objetivo. Se desarrollaron a partir de dominios de receptores extracelulares humanos mediante redistribución de exones *in vitro* y presentación de fagos (Silverman et al., 2005, Nat. Biotechnol. 23:1493-94; Silverman et al., 2006, Nat. Biotechnol. 24:220.) Las proteínas multidominio resultantes pueden comprender múltiples dominios de unión independientes, que pueden exhibir una afinidad mejorada (en algunos casos subnanomolar) y especificidad en comparación con las proteínas de unión de un solo epítipo. (*Id.*) En varias formas de realización, los avímeros pueden unirse a, por ejemplo, secuencias DDA y/o DA para su uso en los métodos y composiciones reivindicados. Se describen detalles adicionales sobre los métodos de construcción y uso de avímeros, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 y 20050221384.

Visualización de fagos

[0126] Ciertas formas de realización de las composiciones y/o métodos pueden referirse a péptidos de unión y/o miméticos de péptidos de diversas moléculas, células o tejidos diana. Los péptidos de unión pueden identificarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, la técnica de visualización de fagos. En la técnica se conocen bien diversos métodos de visualización de fagos y técnicas para producir diversas poblaciones de péptidos. Por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.º 5.223.409; 5.622.699 y 6.068.829 describen métodos para preparar una biblioteca de fagos. La técnica de presentación de fagos implica la manipulación genética de bacteriófagos para que se 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 los péptidos, también se pueden mostrar dominios proteínicos más grandes, como anticuerpos de cadena sencilla, en la superficie de las partículas de fagos (Arap et al., 1998, Science 279:377-380).

[0127] Las secuencias de aminoácidos selectivas para un órgano, tejido, tipo celular o molécula diana dados pueden aislarse mediante selección molecular (Pasqualini y Ruoslahti, 1996, Nature 380:364-366; Pasqualini, 1999, The Quart. J. Nucl. Med. 43:159-162). En resumen, se administra una biblioteca de fagos que contiene péptidos de selección molecular putativos a un organismo intacto o a órganos, tejidos, tipos celulares 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, diana y luego amplificarse cultivándolos en bacterias hospedadoras.

[0128] En ciertas formas de realización, el fago puede propagarse en bacterias hospedadoras entre rondas de selección. En lugar de ser lisado por el fago, las bacterias pueden secretar múltiples copias del fago que muestran un inserto particular. Si se desea, el fago amplificado puede exponerse nuevamente a los órganos, tejidos, tipos de células o moléculas objetivo y recolectarse para rondas adicionales de selección. Pueden realizarse múltiples rondas de selección hasta que se obtenga una población de aglutinantes selectivos o específicos. La secuencia de aminoácidos de los péptidos puede determinarse secuenciando el ADN correspondiente al inserto del péptido de selección en el genoma del fago. El péptido de selección identificado puede luego producirse como un péptido sintético mediante técnicas estándar de química de proteínas (Arap *et al.*, 1998, Smith *et al.*, 1985).

[0129] En algunas formas de realización, se puede utilizar un protocolo de sustracción para reducir aún más la unión de fagos de fondo. El propósito de la sustracción es eliminar fagos de la biblioteca que se unen a objetivos distintos del objetivo de interés. En formas de realización alternativas, la biblioteca de fagos se puede preseleccionar frente a una célula, tejido u órgano de control. Por ejemplo, se pueden identificar péptidos de unión a tumores después de preseleccionar una biblioteca frente a una línea celular normal de control. Después de la sustracción, la biblioteca se puede seleccionar frente a la molécula, célula, tejido u órgano de interés. Se conocen otros métodos de protocolos de sustracción y se pueden utilizar en la práctica de los métodos reivindicados, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. N.º 5.840.841, 5.705.610, 5.670.312 y 5.492.807.

Aptámeros

[0130] En ciertas formas de realización, una fracción de direccionamiento de uso puede ser un aptámero. Los métodos para construir y determinar las características de unión de los aptámeros son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, dichas técnicas se describen en las patentes de EE.UU. números 5.582.981, 5.595.877 y 5.637.459. Los métodos para la

preparación y el cribado de aptámeros que se unen a dianas particulares de interés son bien conocidos, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. números 5.475.096 y 5.270.163.

[0131] Los aptámeros pueden prepararse mediante cualquier método conocido, incluidos los métodos sintéticos, recombinantes y de purificación, y se pueden utilizar solos o en combinación con otros ligandos específicos para el mismo objetivo. En general, se necesita un mínimo de aproximadamente 3 nucleótidos, preferiblemente al menos 5 nucleótidos, para efectuar la unión específica. Pueden ser factibles los aptámeros de secuencias más cortas que 10 bases, aunque pueden preferirse los aptámeros de 10, 20, 30 o 40 nucleótidos.

[0132] Los aptámeros pueden aislarse, secuenciarse y/o amplificarse o sintetizarse como moléculas de ADN o ARN convencionales. Alternativamente, los aptámeros de interés pueden comprender oligómeros modificados. Cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los aptámeros puede reemplazarse por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por un grupo protector estándar o activarse para preparar enlaces adicionales a otros nucleótidos, o puede conjugarse con soportes sólidos. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos, como P(O)O reemplazado por P(O)S, P(O)NR₂, P(O)R, P(O)OR', CO o CNR₂, donde R es H o alquilo (1-20C) y R' es alquilo (1-20C); además, este grupo puede unirse a nucleótidos adyacentes a través de O o S. No todos los enlaces en un oligómero necesitan ser idénticos.

Protocolos de conjugación

[0133] A veces, el protocolo de conjugación se basa en una reacción de tiol-maleimida, tiol-vinilsulfona, tiol-bromoacetamida o tiol-yodoacetamida que son fáciles a pH neutro o ácido. Esto evita la necesidad de condiciones de pH más altas para las conjugaciones como, por ejemplo, serían necesarias cuando se utilizan ésteres activos. Más detalles de protocolos de conjugación ejemplares se describen a continuación en la sección de Ejemplos.

Tratamiento terapéutico

[0134] Se proporciona un método para tratar a un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado terapéutico como se describe en este documento a un sujeto. Las enfermedades que pueden tratarse con los conjugados terapéuticos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, neoplasias malignas de células B (por ejemplo, linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica utilizando, por ejemplo, MAb LL2; véase la patente de EE. UU. N.º 6.183.744), adenocarcinomas de epitelios del sistema digestivo derivados endodérmicamente, cánceres como cáncer de mama y cáncer de pulmón de células no pequeñas, y otros carcinomas, sarcomas, tumores gliales, leucemias mieloides, etc. En particular, se 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, de pulmón, de mama, de próstata, de ovario, testicular, cerebral o linfático, un sarcoma o un melanoma. Estos tratamientos terapéuticos se pueden administrar una sola vez o repetidamente, dependiendo del estado de la enfermedad y la tolerabilidad del conjugado, y también se pueden utilizar de manera óptima en combinación con otras modalidades terapéuticas, como cirugía, radiación externa, radioinmunoterapia, inmunoterapia, quimioterapia, terapia antisentido, terapia con ARN de interferencia, terapia génica y similares. Cada combinación se adaptará al tipo de tumor, estadio, condición del paciente y terapia previa, y otros factores considerados por el médico a cargo.

[0135] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (es decir, vertebrados e invertebrados) que incluye, entre otros, mamíferos, incluidos los seres humanos. No se pretende que el término se limite a una edad o sexo en particular. Por lo tanto, el término abarca sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, ya sean masculinos o femeninos.

[0136] Los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb Mu-9 se pueden utilizar para tratar cáncer colorrectal, así como cáncer de páncreas y de ovario, como se describe en las Patentes de EE. UU. N.º 6.962.702 y 7.387.772. Además, los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb PAM4 se pueden utilizar para tratar cáncer de páncreas, como se describe en las Patentes de EE. UU. N.º 7.238.786 y 7.282.567.

[0137] Los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb RS7 (que se une al antígeno de la glicoproteína epitelial 1 [EGP-1]) se pueden utilizar para tratar carcinomas tales como carcinomas de pulmón, estómago, vejiga urinaria, mama, ovario, útero y próstata, como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 7.238.785.

[0138] Los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb anti-AFP se pueden utilizar para tratar carcinoma hepatocelular, tumores de células germinales y otros tumores productores de AFP utilizando formas de anticuerpos humanizados, quiméricos y humanos, como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 7.300.655.

[0139] Los conjugados terapéuticos que comprenden anticuerpos anti-tenascina se pueden utilizar para tratar tumores hematopoyéticos y sólidos y los conjugados que comprenden anticuerpos contra tenascina se pueden utilizar para tratar tumores sólidos, preferiblemente cánceres cerebrales como glioblastomas.

[0140] Los anticuerpos que se utilizan en el tratamiento de enfermedades humanas pueden ser versiones humanas o humanizadas (injertadas con CDR) de anticuerpos; aunque se pueden utilizar versiones murinas y quiméricas de

anticuerpos. Las moléculas de IgG de la misma especie como agentes de administración son las preferidas en su mayoría para minimizar las respuestas inmunitarias. Esto es particularmente importante cuando se consideran tratamientos repetidos. Para los seres humanos, es menos probable que un anticuerpo IgG humano o humanizado genere una respuesta inmunitaria anti-IgG de los pacientes. Los anticuerpos como hLL1 y hLL2 se internalizan rápidamente después de unirse al antígeno internalizante en las células diana, lo que significa que el fármaco quimioterapéutico que se transporta también se internaliza rápidamente en las células. Sin embargo, los anticuerpos que tienen tasas de internalización más lentas también se pueden utilizar para efectuar una terapia selectiva.

[0141] Los conjugados terapéuticos pueden utilizarse contra patógenos, ya que se conocen anticuerpos contra patógenos. Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a marcadores producidos por o asociados con lesiones infecciosas, incluyendo infecciones virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias, por ejemplo causadas por patógenos tales como bacterias, rickettsias, micoplasmas, protozoos, hongos y virus, y antígenos y productos asociados con tales microorganismos se han descrito, *entre otros*, en Hansen et al., Patente de EE. UU. N° 3.927.193 y Goldenberg Patentes de EE. UU. N° 4.331.647, 4.348.376, 4.361.544, 4.468.457, 4.444.744, 4.818.709 y 4.624.846, y en Reichert y Dewitz, citados anteriormente. Los patógenos se seleccionan del grupo que consiste en 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 influenza, citomegalovirus, virus del herpes simple I, virus del herpes simple II, virus similar al parvovirus 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 de células T humanas, 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 Sendai, virus de la leucemia felina, reovirus, virus de la polio, virus del 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 rhodesiense*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Babesia bovis*, *Elmeria tenella*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania tropica*, *Trichinella spiralis*, *Theileria parva*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocostoides corti*, *Mycoplasma artritidis*, *M. hyorhinis*, *M. orate*, *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. salivarium* y *M. pneumoniae*, como se describe en la patente de EE. UU. N° 6.440.416.

[0142] Los conjugados de fármacos que comprenden anticuerpos anti-gp120 y otros anticuerpos anti-VIH similares se pueden utilizar como agentes terapéuticos para el VIH en pacientes con SIDA; y los conjugados de fármacos de anticuerpos contra *Mycobacterium tuberculosis* son adecuados como agentes terapéuticos para la tuberculosis refractaria a fármacos. Se han examinado las proteínas de fusión de MAb anti-gp120 (MAb anti-VIH) y una toxina, como la exotoxina de *Pseudomonas*, en busca de propiedades antivirales (Van Oigen et al., J Drug Target, 5:75-91, 1998). Los intentos de tratar la infección por VIH en pacientes con SIDA fracasaron, posiblemente debido a una eficacia insuficiente o una toxicidad inaceptable para el huésped. Los conjugados de fármacos descritos en el presente documento carecen ventajosamente de dichos efectos secundarios tóxicos de las toxinas proteínicas y, por lo tanto, se utilizan ventajosamente para tratar la infección por VIH en pacientes con SIDA. Estos conjugados de fármacos se pueden administrar solos o en combinación con otros antibióticos o agentes terapéuticos que son eficaces en dichos pacientes cuando se administran solos. Los anticuerpos anti-VIH candidatos incluyen el anticuerpo anti-envoltura descrito por Johansson et al. (AIDS 2006 Oct 3;20(15):1911-5), así como los anticuerpos anti-VIH descritos y vendidos por Polymun (Viena, Austria), también descritos en la Patente de EE. UU. 5.831.034, Patente de EE. UU. 5.911.989, y Vcelar et al., AIDS 2007;21(16):2161-2170 y Joos et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2006;50(5):1773-9. Un agente de selección preferido para el VIH son varias combinaciones de estos anticuerpos con el fin de superar la resistencia.

[0143] Las enfermedades que pueden tratarse utilizando los conjugados terapéuticos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de desregulación inmunitaria y enfermedades autoinmunes relacionadas, incluidas enfermedades autoinmunes de Clase III, tales como trombocitopenias inmunomediadas, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, corea de Sydenham, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide ampuloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis postestreptocócica, eritema nodoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, Nefropatía por IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, artritis reumatoide, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/gigantocelulitis, anemia perniciosa, glomerulonefritis de progresión rápida y alveolitis fibrosante, y también diabetes juvenil, como se describe en la solicitud provisional de EE. UU. con número de serie 60/360.259, presentada el 1 de marzo de 2002 (ahora vencida). Los anticuerpos típicos útiles en estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, aquellos 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, la reducción de estas células B mediante conjugados terapéuticos que implican dichos conjugados de anticuerpos y

agentes terapéuticos descritos en el presente documento es un método 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 IL-2 como antígeno, como el anticuerpo anti-TAC). Los anticuerpos anti-células B, anti-células T o anti-macrófagos u otros anticuerpos similares que se utilizan en el tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunes también se pueden conjugar para dar como resultado terapias más eficaces para controlar las respuestas del huésped implicadas en dichas enfermedades autoinmunes, y se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, como inhibidores de TNF o anticuerpos TNF, anticuerpos de células B o T no conjugados y similares.

[0144] Se puede lograr una incorporación más eficaz en células y patógenos mediante el uso de anticuerpos multivalentes, multiespecíficos o multivalentes, monoespecíficos. Se encuentran ejemplos de dichos anticuerpos bivalentes y biespecíficos en las Patentes de EE. UU. N.º 7.387.772; 7.300.655; 7.238.785; y 7.282.567. Estos anticuerpos multivalentes o multiespecíficos son particularmente preferidos en la selección de dianas de cánceres y organismos infecciosos (patógenos), que expresan múltiples dianas antigénicas e incluso múltiples epítomos de la misma diana antigénica, pero que a menudo evaden la selección de dianas de anticuerpos y la unión suficiente para la inmunoterapia debido a la expresión o disponibilidad insuficiente de una única diana antigénica en la célula o patógeno. Al seleccionar dianas de múltiples antígenos o epítomos, dichos anticuerpos muestran una unión y un tiempo de residencia más altos en la diana, lo que proporciona una mayor saturación con el fármaco al que se dirigen.

[0145] Un agente terapéutico utilizado en combinación con el conjugado de camptotecina descrito en este documento puede comprender uno o más isótopos. Los isótopos radiactivos útiles para tratar tejido enfermo 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, ¹⁹⁹Au y ²¹¹Pb. El radionúclido terapéutico tiene preferiblemente una energía de desintegración en el intervalo de 20 a 6.000 keV, preferiblemente en los intervalos 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 de desintegración máximas de los núclidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente de 20-5.000 keV, más preferiblemente de 100-4.000 keV y lo más preferiblemente de 500-2.500 keV. También se prefieren los radionúclidos que se desintegran sustancialmente con partículas que emiten 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 lo más preferiblemente <70 keV. También se prefieren los radionúclidos que se desintegran sustancialmente con la generación de partículas alfa. Dichos radionúclidos incluyen, entre otros: 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 radionúclidos emisores de partículas alfa útiles son preferiblemente de 2.000 a 10.000 keV, más preferiblemente de 3.000 a 8.000 keV y, lo más preferiblemente, de 4.000 a 7.000 keV. Otros radioisótopos potenciales de uso incluyen ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁵Br, ¹⁹⁸Au, ²²⁴Ac, ¹²⁶I, ¹³³I, ⁷⁷Br, ¹¹³mIn, ⁹⁵Ru, ⁹⁷Ru, ¹⁰³Ru, ¹⁰⁵Ru, ¹⁰⁷Hg, ²⁰³Hg, ¹²¹mTe, ¹²²mTe, ¹²⁵mTe, ¹⁶⁵Tm, ¹⁶⁷Tm, ¹⁶⁸Tm, ¹⁹⁷Pt, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁵Rh, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Ho, ¹⁹⁹Au, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵¹Cr, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ²⁰¹Tl, ²²⁵Ac, ⁷⁶Br, ¹⁶⁹Yb y similares.

[0146] Los radionúclidos y otros metales pueden administrarse, por ejemplo, utilizando grupos quelantes unidos a un anticuerpo o conjugado. Los quelatos macrocíclicos tales como NOTA, DOTA y TETA son útiles con una variedad de metales y radiometales, más particularmente con radionúclidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Dichos complejos de metal-quelato pueden hacerse muy estables adaptando el tamaño del anillo al metal de interés. Pueden utilizarse otros quelatos de tipo anillo, tales como polímeros macrocíclicos para complejar ²²³Ra.

[0147] Los agentes terapéuticos de uso en combinación con los conjugados de camptotecina descritos en el presente documento también incluyen, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos tales como alcaloides de la vinca, antraciclina, epidofilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de la Cox-2, antimetabólicos, agentes antiangiogénicos y proapoptóticos, particularmente 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, sulfonatos de alquilo, 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, 19.ª edición. (Mack Publishing Co. 1995), y en GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985), así como ediciones revisadas de estas publicaciones. Los expertos en la materia conocen otros agentes quimioterapéuticos adecuados, como fármacos experimentales.

[0148] Los fármacos ejemplares de uso incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, apilidina, azaribina, anastrozol, antracilina, bendamustina, bleomicina, bortezomib, briostatina-1, busulfán, caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, 10-hidroxycamptotecina, carmustina, celebex, clorambucilo, cisplatino (CDDP), inhibidores de Cox-2, irinotecán (CPT-11), SN-38, carboplatino, cladribina, camptotecanos, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, docetaxel, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina (2P-DOX), cianomorfolinodoxorrubicina, glucurónido de doxorubicina, glucurónido de epirubicina, estramustina, epidofilotoxina, agentes de unión al receptor de estrógeno, etopósido (VP 16), glucurónido de etopósido, fosfato de etopósido, floxuridina (FUdR), 3',5'-O-dioleoil-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, gemcitabina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, L-asparaginasa, lenolidamida, leucovorina, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, navelbina, nitrosourea, plicomicina, procarbazona, paclitaxel,

5 pentostatina, PSI-341, raloxifeno, semustina, estreptozocina, tamoxifeno, taxol, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecán, mostaza de uracilo, vinorelbina, vinblastina, vincristina y alcaloides de la vinca. Dichos agentes pueden formar parte de los conjugados descritos en el presente documento 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, como se conocen en la técnica, pueden usarse en combinación con los conjugados descritos. En la sección anterior se describen anticuerpos terapéuticos desnudos ejemplares.

10 **[0149]** Los agentes terapéuticos que pueden utilizarse en conjunto con los conjugados de camptotecina también pueden comprender toxinas conjugadas con fracciones de orientación. Las toxinas que pueden utilizarse a este respecto incluyen ricina, abrina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antiviral de la hierba carmín, gelonina, toxina de la diferina, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*. (Véase, por ejemplo, Pastan et al., *Cell* (1986), 47:641, y Sharkey y Goldenberg, *CA Cancer J Clin.* 2006 Jul-Aug;56(4):226-43.) Los expertos en la materia conocen toxinas adicionales adecuadas para su uso en la presente memoria y se describen en el documento US 6.077.499.

15 **[0150]** Otra clase adicional de agente terapéutico puede comprender uno o más inmunomoduladores. Los inmunomoduladores de uso pueden seleccionarse de una citocina, un factor de crecimiento de células madre, una linfotoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF), un interferón (IFN), eritropoyetina, trombopoyetina y una combinación de los mismos. Específicamente útiles son las linfotoxinas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), factores hematopoyéticos, tales como interleucina (IL), factor estimulante de colonias, tal como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón, tal como interferones- α , - β o - γ , y factor de crecimiento de células madre, tal como el denominado "factor S1". Entre las citocinas se incluyen hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana N-metionil y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas como la hormona foliculo estimulante (HFE), la hormona estimulante de la tiroides (HET) y la hormona luteinizante (HL); 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 Müller; 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-1 y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones como interferón- α , - β y - γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófagos-CSF (MCSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, ligando kit o FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, factor de necrosis tumoral y LT. Tal como se utiliza en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

20 **[0151]** Las quimiocinas de uso incluyen RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-Beta e IP-10.

40 **Formulación y administración**

45 **[0152]** Las vías de administración adecuadas de los conjugados incluyen, sin limitación, administración oral, parenteral, rectal, transmucosa, intestinal, intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intravítrea, intraperitoneal, intranasal o inyecciones intraoculares. Las vías de administración preferidas son la parenteral. Alternativamente, se puede administrar el compuesto de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección del compuesto directamente en un tumor sólido.

50 **[0153]** Los inmunoconjugados se pueden formular de acuerdo con 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 tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un excipiente farmacéuticamente adecuado. Otros excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Ansel et al., *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS*, 5.^a edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), *REMITON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 18.^a edición (Mack Publishing Company 1990), y ediciones revisadas de la misma.

55 **[0154]** El inmunoconjugado puede formularse para administración intravenosa mediante, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención se infunde durante un período de menos de aproximadamente 4 horas, y más preferiblemente, durante un período de menos de aproximadamente 3 horas. Por ejemplo, los primeros 25-50 mg podrían infundirse en 30 minutos, preferiblemente incluso 15 minutos, y el resto infundirse durante las siguientes 2-3 horas. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación 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.

[0155] Se pueden emplear métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción del conjugado terapéutico. Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para formar complejos o adsorber el inmunoc conjugado. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli(etileno-co-acetato de vinilo) y matrices de un copolímero de polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebáico. Sherwood et al., *Bio/Technology* 10: 1446 (1992). La velocidad de liberación de un inmunoc conjugado a partir de dicha matriz depende del peso molecular del inmunoc conjugado, la cantidad de inmunoc conjugado dentro de la matriz y el tamaño de las partículas dispersas. Saltzman et al., *Biophys. J.* 55: 163 (1989); Sherwood *et al., supra*. Otras formas de dosificación sólidas se describen en Ansel et al., *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS*, 5.^a edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 18.^a edición (Mack Publishing Company 1990), y ediciones revisadas del mismo.

[0156] Generalmente, la dosis de un inmunoc conjugado administrado para humanos variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, la condición médica general y el historial médico previo del paciente. Puede ser deseable proporcionar al receptor una dosis de inmunoc conjugado que esté en el rango de aproximadamente 1 mg/kg a 25 mg/kg como una infusión intravenosa única, aunque también se puede administrar una dosis menor o mayor según lo 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 de 41-824 mg/m² para un paciente de 1,7 m. La dosis se puede repetir según sea necesario, por ejemplo, una vez por semana durante 4-10 semanas, una vez por semana durante 8 semanas, o una vez por semana durante 4 semanas. También se puede administrar con menor frecuencia, como cada dos semanas durante varios meses, o mensualmente o trimestralmente durante muchos meses, según sea necesario en una terapia de mantenimiento.

[0157] Como alternativa, un inmunoc conjugado 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. Como alternativa, el programa de dosificación puede reducirse, es decir, cada 2 o 3 semanas durante 2-3 meses. Sin embargo, se ha determinado que se pueden administrar dosis incluso más altas, como 20 mg/kg una vez por semana o una vez cada 2-3 semanas mediante infusión intravenosa lenta, para ciclos de dosificación repetidos. El programa de dosificación puede repetirse opcionalmente a otros intervalos y la dosificación puede administrarse a través de varias vías parenterales, con un ajuste apropiado de la dosis y el programa.

[0158] Los inmunoc conjugados pueden ser útiles para la terapia del cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma y leucemia, mieloma o neoplasias malignas linfoides. A continuación se indican ejemplos más particulares de dichos cánceres que incluyen: cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), 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 de tiroides medular, carcinoma de tiroides diferenciado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándula salival, 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 en el cuerpo del sujeto distintos del sitio de la malignidad o tumor original) y células o tumores malignos secundarios (por ejemplo, aquellos que surgen de la metástasis, la migración de células malignas o células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

[0159] Otros ejemplos de cánceres o neoplasias malignas incluyen, pero no se limitan a: leucemia linfoblástica infantil aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cáncer hepatocelular (primario) en adultos, cáncer de hígado (primario) en adultos, leucemia linfocítica aguda en adultos, leucemia mieloide aguda en adultos, linfoma de Hodgkin en adultos, leucemia linfocítica en adultos, linfoma no Hodgkin en adultos, cáncer de hígado primario en adultos, sarcoma de tejidos blandos en adultos, linfoma relacionado con el SIDA, neoplasias malignas relacionadas con el SIDA, cáncer anal, astrocitoma, cáncer de los conductos biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de la pelvis renal y el uréter, linfoma del sistema nervioso central (primario), Linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer hepatocelular (primario) infantil, cáncer de hígado (primario) infantil, leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma del tronco encefálico infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores de células germinales extracraneales infantiles, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin infantil, glioma hipotalámico y de la vía visual infantil, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no Hodgkin infantil, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineales infantiles, cáncer de hígado primario infantil, rhabdomiocarcinoma infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, vías visuales y hipotálamo infantil. Glioma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, carcinoma de células de los islotes del páncreas endocrino, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing y tumores relacionados, Cáncer de páncreas exocrino, Tumor de células germinativas extracraneal, Tumor de células germinativas extragonadal, Cáncer de conducto biliar extrahepático, Cáncer

de ojo, Cáncer de mama femenino, Enfermedad de Gaucher, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer gástrico, Tumor carcinoide gastrointestinal, Tumores gastrointestinales, Tumores de células germinativas, Tumor trofoblástico gestacional, Leucemia de células pilosas, Cáncer de cabeza y cuello, Cáncer hepatocelular, Linfoma de Hodgkin, Hipergammaglobulinemia, Cáncer de hipofaringe, Cánceres intestinales, Melanoma intraocular, Carcinoma de células de los islotes, Cáncer de páncreas 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 de cuello escamoso primario oculto metastásico, cáncer de cuello escamoso primario metastásico, cáncer de cuello escamoso metastásico, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal y senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello escamoso primario metastásico oculto, cáncer orofaríngeo, sarcoma fibroso osteomaligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, Tumor con potencial maligno bajo de ovario, 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 rectal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcomas sarcoidosis, síndrome de Sézary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago, tumores neuroectodérmicos y pineales primitivos supratentoriales, 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 uretral, cáncer de útero, sarcoma de útero, cáncer vaginal, glioma de las vías visuales y del hipotálamo, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de la neoplasia, ubicada en un sistema de órganos enumerado anteriormente.

[0160] Los métodos y composiciones descritos 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. Dichos usos están indicados en afecciones que se sabe o se sospecha que preceden a la progresión a neoplasia o cáncer, en particular, cuando se ha producido un crecimiento celular no neoplásico que consiste en hiperplasia, metaplasia o, más particularmente, displasia (para una revisión de dichas afecciones de crecimiento anormal, véase Robbins y Angell, Basic Pathology, 2.^a edición, WB Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-79 (1976)).

[0161] La displasia es frecuentemente 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 en la uniformidad de las células individuales y en la orientación arquitectónica de las células. La displasia se produce característicamente donde existe irritación o inflamación crónica. Los trastornos displásicos que se pueden tratar incluyen, entre otros, displasia ectodérmica anhidrótica, displasia anterofacial, displasia torácica asfixiante, displasia atriadigital, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia cervical, displasia condroectodérmica, displasia cleidocraneal, displasia ectodérmica congénita, displasia craneodifisaria, displasia craneocarpotarsal, displasia craneometafisaria, displasia dentinaria, displasia diafisaria, displasia ectodérmica, displasia del esmalte, displasia encefaloftálmica, displasia epifisial hemimelia, displasia epifisial múltiple, displasia epifisial punctata, displasia epitelial, displasia faciодigitogenital, displasia fibrosa familiar de mandíbulas, displasia blanca familiar, displasia fibromuscular, displasia fibrosa del hueso, displasia ósea florida, displasia retiniana-renal 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 oculovertebral, displasia odontogénica, displasia oftalmomandibulomélica, displasia cemental periapical, displasia fibrosa polioestótica, displasia espondiloepifisaria pseudocondroplásica, displasia retiniana, displasia septoóptica, displasia espondiloepifisaria y displasia ventricularadial.

[0162] Los trastornos preneoplásicos adicionales que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, trastornos disproliferativos benignos (por ejemplo, tumores benignos, afecciones fibroquísticas, hipertrofia tisular, pólipos o adenomas intestinales y displasia esofágica), leucoplasia, queratosis, enfermedad de Bowen, piel de granjero, queilitis solar y queratosis solar.

[0163] A veces, el método se utiliza para inhibir el crecimiento, la progresión y/o la metástasis de cánceres, en particular los enumerados anteriormente.

[0164] Las enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas adicionales incluyen, pero no se limitan a, progresión y/o metástasis de neoplasias malignas y trastornos relacionados, tales como leucemia (incluidas leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluidas mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de la cadena pesada y tumores sólidos que incluyen, pero no se limitan a, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma,

linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiosarcoma, 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 las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, emangioblastoma, neurinoma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Kits

[0165] Los kits que contienen componentes adecuados para tratar tejido enfermo en un paciente pueden contener al menos un anticuerpo conjugado u otra fracción de direccionamiento como se describe en este documento. Si la composición que contiene componentes para administración no está formulada para administración a través del canal alimentario, como por administración oral, se puede incluir un dispositivo capaz de administrar los componentes del kit a través de alguna otra vía. Un tipo de dispositivo, para aplicaciones como administración parenteral, es una jeringa que se utiliza para inyectar la composición en el cuerpo de un sujeto. También se pueden utilizar dispositivos de inhalación.

[0166] Los componentes del kit pueden envasarse juntos o separados en dos o más recipientes. En algunas formas de realización, los recipientes pueden ser viales que contienen formulaciones liofilizadas estériles 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 usarse incluyen, pero no se limitan a, una bolsa, bandeja, caja, tubo o similares. Los componentes del kit pueden envasarse y mantenerse estériles dentro de los recipientes. Otro componente que puede incluirse son instrucciones para una persona que usa un kit para su uso.

EJEMPLOS

[0167] Varias formas de realización se ilustran mediante los siguientes ejemplos.

General

[0168] 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.

[0169] Los cloroformatos de compuestos hidroxilados en los siguientes ejemplos se prepararon utilizando trifosgeno y DMAP de acuerdo con el procedimiento descrito en Moon et al. (J. Medicinal Chem. 51:6916-6926, 2008). El tratamiento extractivo se refiere a la extracción con cloroformo, diclorometano o acetato de etilo, y lavado opcionalmente con bicarbonato saturado, agua y con cloruro de sodio saturado. La cromatografía flash se realizó utilizando gel de sílice de malla 230-400 y gradiente de metanol-diclorometano, utilizando hasta 15 % v/v de metanol-diclorometano, a menos que se indique lo contrario. La HPLC de fase inversa se realizó mediante el Método A utilizando una columna de HPLC C18 de 7,8 x 300 mm, equipada con un filtro de precolumna, y utilizando un gradiente de disolvente de 100 % de disolvente A a 100 % de disolvente B en 10 minutos a una velocidad de flujo de 3 ml por minuto y manteniendo el 100 % de disolvente B a una velocidad de flujo de 4,5 ml por minuto durante 5 o 10 minutos; o mediante el Método B utilizando una columna Xbridge C18 de 4,6 x 30 mm, 2,5 mm, equipada con un filtro de precolumna, utilizando el gradiente de disolvente de 100 % de disolvente A a 100 % de disolvente B a una velocidad de flujo de 1,5 ml por minuto durante 4 min y 100 % de disolvente B a una velocidad de flujo de 2 ml por minuto durante 1 minuto. El disolvente A fue acetato de amonio acuoso al 0,3 %, pH 4,46, mientras que el disolvente B fue acetonitrilo-acetato de amonio acuoso 9:1 (0,3 %), pH 4,46. La HPLC se controló mediante un detector de absorbancia dual en línea ajustado a 360 nm y 254 nm.

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

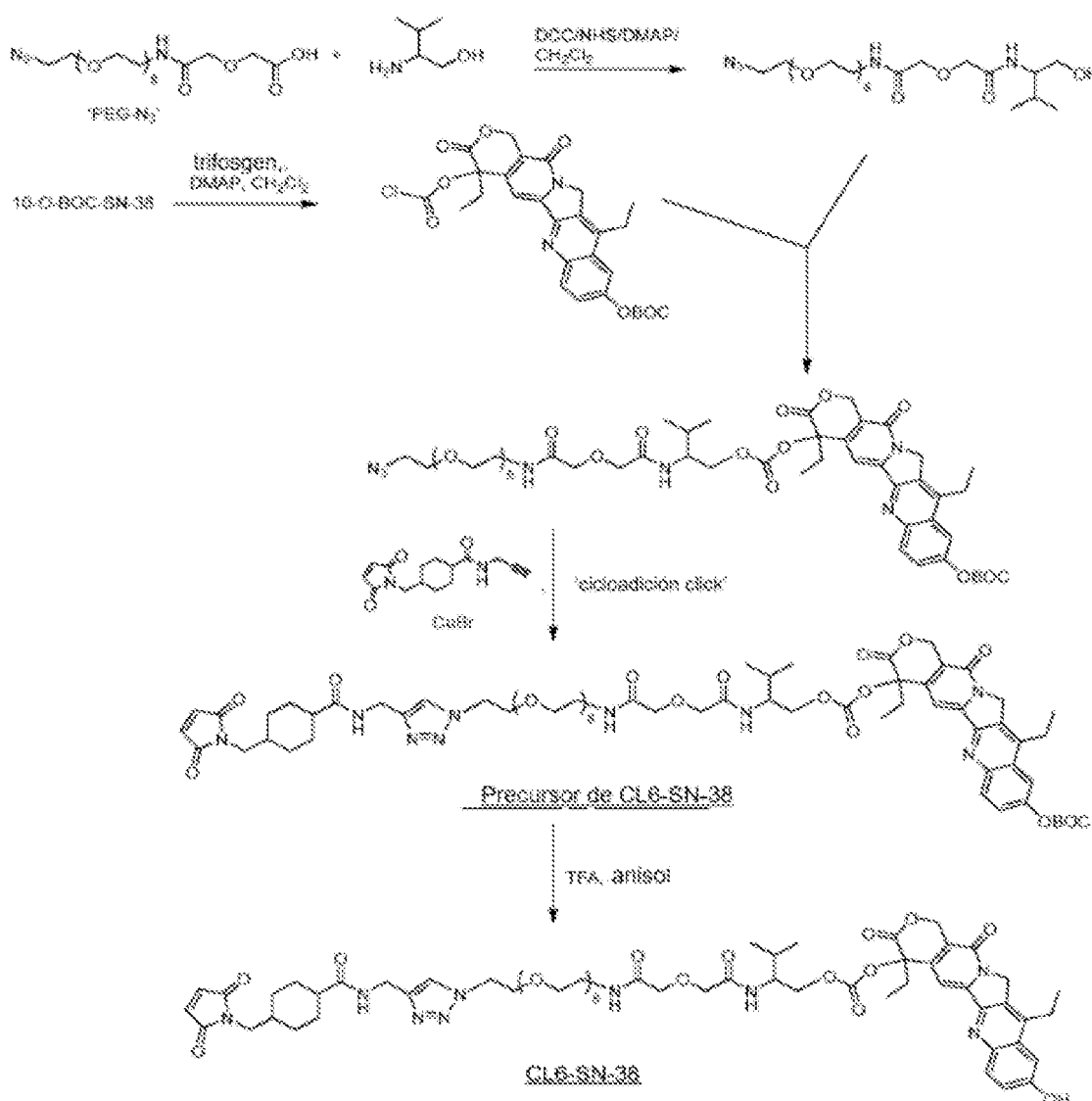
[0170] CL6-SN-38 se representa en el Esquema-1. El O-(2-azidoetil)-O'-(*N*-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N₃'; 227 mg) disponible comercialmente se activó con DCC (100 mg), NHS (56 mg) y una cantidad catalítica de DMAP en 10 ml de diclorometano durante 10 min. A esta mezcla se añadió 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 produjeron 214 mg de un material oleoso transparente. Este intermedio (160 mg) se hizo reaccionar con 10-O-BOC-SN-38-20-O-cloroformiato, 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 mediante cromatografía flash para obtener 130 mg (rendimiento del 45 %) de producto como material espumoso. HPLC: *t*_R 11,80 min; espectro de masas por electrospray: M+Na: m/z 1181.

[0171] El reactivo acetilénico que contiene maleimida, concretamente 4-(*N*-maleimidometil)-*N*-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida, necesario para la cicloadición click, 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. Después de 1 h, se eliminó el disolvente y se purificó el producto mediante cromatografía flash para obtener 83 mg del producto (polvo incoloro). El espectro de masas por electrospray mostró picos en m/e 275 (M+H) y un pico base en m/e 192 en el modo de ion positivo, consistente con la estructura calculada para C₁₅H₁₈N₂O₃: 275,1390 (M+H), encontrado: 275,1394 (masa exacta).

[0172] 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, después del tratamiento de la mezcla de reacción, proporcionó 116 mg (rendimiento del 75 %) del producto de cicloadición. HPLC: t_R 11,20 min; espectro de masas por 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 produjo el producto, CL6-SN-38, como un material gomoso. HPLC: t_R 9,98 min; espectro de masas por electrospray: M+H y MH (modo de ion negativo) a m/z 1333 y 1356, respectivamente.

Esquema 1



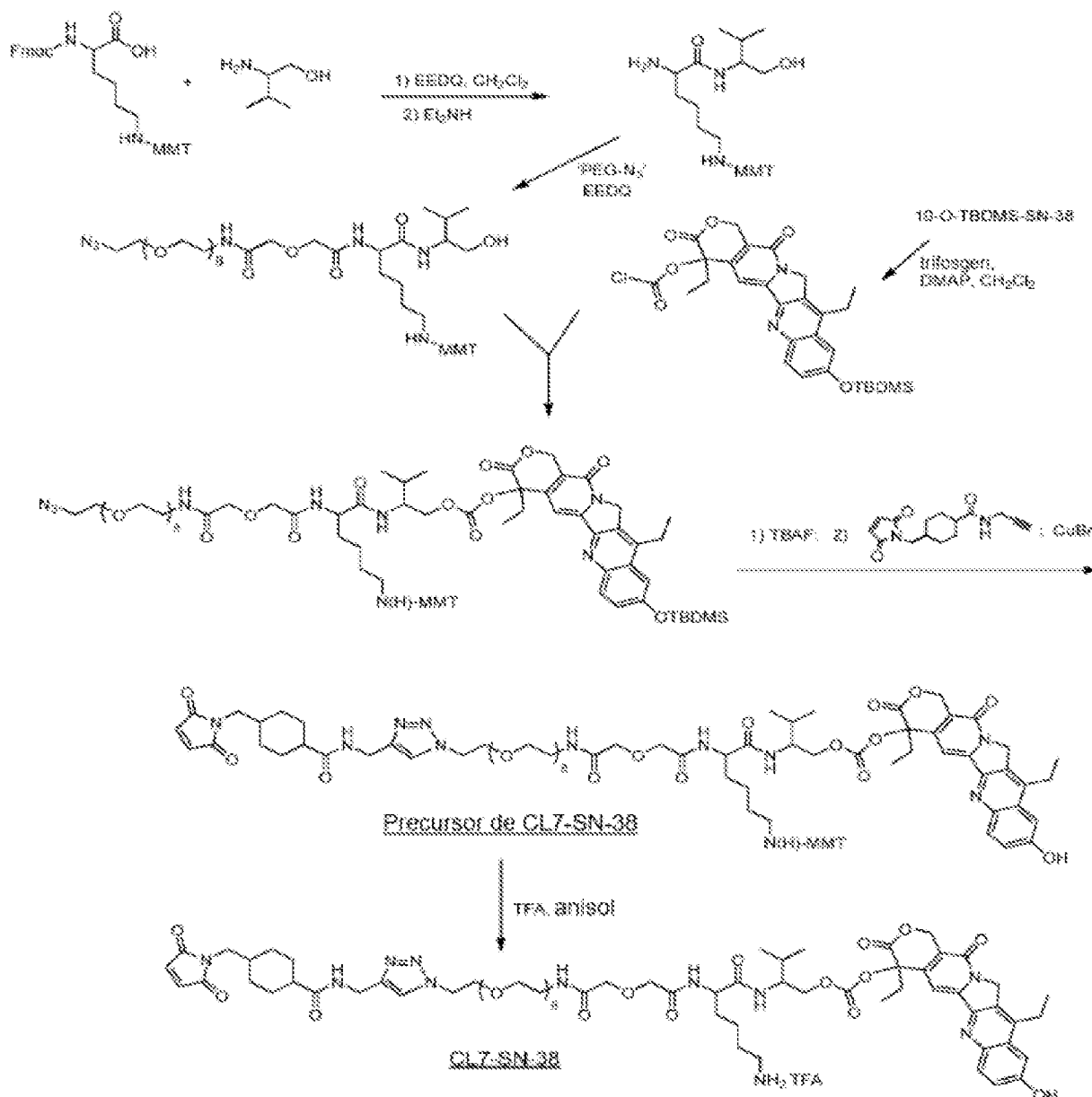
Ejemplo de referencia 2: Preparación de CL7-SN-38

[0173] La síntesis se muestra esquemáticamente en el Esquema-2. Se hizo reaccionar L-Valinol (40 mg) con Fmoc-Lys(MMT)-OH (253 mg) y EEDQ (107 mg) disponibles comercialmente en 10 ml de diclorometano anhidro a temperatura ambiente, bajo argón, durante 3 h. El tratamiento extractivo seguido de cromatografía flash proporcionó el producto Fmoc-Lys(MMT)-valinol como un líquido amarillo pálido (200 mg; rendimiento ~ 70%). HPLC: t_R 14,38 min; espectro de masas por 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% después de la cromatografía flash. HPLC: t_R 10,91 min; espectro de masas por

electrospray: M+Na a m/z 527. Este producto (135 mg) se acopló con el O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('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 la noche a temperatura ambiente. El material crudo se purificó por cromatografía flash para obtener 240 mg del producto purificado como un aceite amarillo claro (rendimiento de ~ 87%). HPLC: t_R 11,55 min; espectro de masas por electrospray: M+H y M+Na a m/z 1041 y 1063, respectivamente.

[0174] Este intermedio (240 mg) se hizo reaccionar con 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-cloroformiato, 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 en forma de espuma de color amarillo pálido. Espectro de masas por electrospray: M+H a m/z 1574. Todo el producto 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 crudo (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, produjo 69 mg de CL7-SN-38 como un material gomoso. HPLC: t_R 9,60 min; espectro de masas por electrospray: M+H y MH (modo de ion negativo) a m/z 1461 y 1459, respectivamente.

Esquema 2



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

[0175] El CL6-SN-38 del Ejemplo 1 (55,4 mg) se disolvió en diclorometano (5 ml), y se hizo reaccionar con cloroformiato 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 de cada uno de HCl 0,1 M, bicarbonato de sodio semisaturado y salmuera, y se secó. La cromatografía flash, después de la eliminación del disolvente, proporcionó 59 mg del producto del título. HPLC: t_R 10,74 min; masa exacta: calc. 1404,6457 (M+H) y 1426,6276 (M+Na); encontrado: 1404,6464 (M+H) y 1426,6288 (M+Na).

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

[0176] El precursor de CL7-SN-38 del Ejemplo 2 (80 mg) se convirtió en el 10-O-cloroformiato utilizando el procedimiento y la purificación como se describe en el Ejemplo 3. Rendimiento: 60 mg. HPLC: t_R 12,32 min; espectro de masas por electrospray: M+H y M-H (modo de ion negativo) 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 por electrospray: M+H a m/z 1534.

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

[0177] 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 modo 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 después de 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 una sal cuaternaria para una solubilidad acuosa mejorada, o " $R_1O-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-O-$ " donde R₁ es etilo o metilo y n es un número entero con valores de 0-10. En la versión más simple de la última categoría, R = " $-O-(CH_2)_2-OCH_3$ ". Estos derivados 10-hidroxi se preparan fácilmente mediante tratamiento con el cloroformiato del reactivo elegido, si el derivado final va a ser un carbonato. Normalmente, la camptotecina que contiene 10-hidroxi, como SN-38, se trata con un equivalente molar del cloroformiato en dimetilformamida utilizando trietilamina como base. En estas condiciones, la posición 20-OH no se ve afectada. Para formar 10-O-ésteres, se utiliza el cloruro de ácido del reactivo elegido. Dichas derivatizaciones se llevan a cabo de forma conveniente utilizando intermedios avanzados como se ilustra para los carbonatos de etilo simples de los Ejemplos 3 y 4.

Ejemplo de referencia 6: Preparación de CL6-paclitaxel

[0178] El valinol se acopla a 'PEG-N3' del Esquema-1 de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El producto se hace reaccionar con 0,4 equivalentes molares de trifosgeno, 3,1 equivalentes molares de DMAP, en diclorometano. Después de 5 minutos, el cloroformiato así formado se hace reaccionar con una cantidad equimolar de paclitaxel durante 15 minutos a temperatura ambiente. El grupo hidroxilo 2' reactivo del paclitaxel (el grupo hidroxilo secundario de la cadena lateral) reacciona con el cloroformiato del agente de reticulación. El producto se aísla mediante 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, después del tratamiento de la mezcla de reacción, proporciona el paclitaxel bifuncional, concretamente CL6-paclitaxel.

Ejemplo de referencia 7: Preparación de CL7-paclitaxel

[0179] Se hace reaccionar L-valinol (40 mg) con Fmoc-Lys(MMT)-OH disponible comercialmente, y luego el producto se hace reaccionar con O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N₃'), como se describe en el Ejemplo 2. El cloroformiato de este derivado se forma mediante el método del Ejemplo 6, y se hace reaccionar con una cantidad equimolar de paclitaxel. El grupo 2'-hidroxilo reactivo de paclitaxel (el grupo hidroxilo secundario de la cadena lateral) reacciona con el cloroformiato del agente de reticulación. A continuación, se realiza una cicloadición click, utilizando 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida (preparada como se describe en el Ejemplo 1) de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 6, y finalmente el producto se trata con ácido dicloroacético y anisol para efectuar la eliminación del grupo 'MMT' en condiciones suaves. Este proceso proporciona CL7-paclitaxel.

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

[0180] El valinol se acopla a 'PEG-N₃' del Esquema-1 de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El producto se hace reaccionar con 0,4 equivalentes molares de trifosgeno, 3,1 equivalentes molares de DMAP, en diclorometano. Después de 5 minutos, el cloroformiato así formado se hace reaccionar con una cantidad equimolar de morfolino doxorubicina durante 15 minutos a temperatura ambiente. El grupo hidroxilo primario de la morfolino doxorubicina reacciona con el cloroformiato del agente de reticulación. El producto se aísla mediante 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, después del tratamiento de la mezcla de reacción, proporciona el paclitaxel bifuncional, es decir CL6-[morfolino doxorubicina].

5 Ejemplo de referencia 9: Preparación de CL7-[morfolino doxorubicina]

10 [0181] Se hace reaccionar L-valinol (40 mg) con Fmoc-Lys(MMT)-OH disponible comercialmente, y luego el producto se hace reaccionar con O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N₃'), como se describe en el Ejemplo 2. El cloroformiato de este derivado se forma mediante el método del Ejemplo 6, y se hace reaccionar con una cantidad equimolar de morfolino doxorubicina. El grupo hidroxilo primario de morfolino doxorubicina reacciona con el cloroformiato del agente de reticulación. A continuación, se realiza una cicloadición click, utilizando 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida (preparada como se describe en el Ejemplo 1) de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 6, y finalmente el producto se trata con ácido dicloroacético y anisol para efectuar la eliminación del grupo 'MMT' en condiciones suaves. Este proceso proporciona CL7-[morfolino doxorubicina].

15

Ejemplo 10: Preparación de CL2A-SN-38

20 [0182] A la mezcla de Fmoc-Lys(MMT)-OH (0,943 g) disponible comercialmente, se añadió alcohol *p*-aminobencílico (0,190 g) en cloruro de metileno (10 ml) EEDQ (0,382 g) a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h. El tratamiento extractivo seguido de cromatografía flash produjo 1,051 g de material en forma de espuma blanca. Todos los análisis de HPLC se realizaron mediante el Método B como se indica en 'General' en la sección 0148. Tiempo de ret. de HPLC: 3,53 min., el espectro de masas de electrospray mostró picos a m/e 745,8 (M+H) y m/e 780,3 (M+Cl⁻), consistente con la estructura. Este intermedio (0,93 g) se disolvió en dietilamina (10 ml) y se agitó durante 2 h. Después de la eliminación del disolvente, el residuo se lavó en hexano para obtener 0,6 g del intermedio ((2) en el Esquema-3) como precipitado incoloro (91,6% puro por HPLC). Tiempo de ret. de HPLC: 2,06 min. El espectro de masas de electrospray mostró picos a m/e 523,8 (M+H), m/e 546,2 (M+Na) y m/e 522,5 (MH).

25

30 [0183] 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 utilizando EEDQ en cloruro de metileno (10 ml). La eliminación del disolvente y la cromatografía flash produjeron 0,99 g del producto ((3) en el Esquema-3; aceite amarillo claro; rendimiento del 87 %). Tiempo de ret. de HPLC: 2,45 min. El espectro de masas por electrospray mostró picos a m/e 1061,3 (M+H), m/e 1082,7 (M+Na) y m/e 1058,8 (MH), coherentes con la estructura. Este intermedio (0,92 g) se hizo reaccionar con 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-cloroformiato ((5) en el Esquema-3) en cloruro de metileno (10 ml) durante 10 min bajo argón. La mezcla se purificó por cromatografía flash para obtener 0,944 g como un aceite amarillo claro ((6) en el Esquema-3; rendimiento = 68%). Tiempo de ret. de HPLC: 4,18 min. A este intermedio (0,94 g) en cloruro de metileno (10 ml) se añadió la mezcla de TBAF (1 M en THF, 0,885 ml) y ácido acético (0,085 ml) en cloruro de metileno (3 ml), luego se agitó durante 10 min. La mezcla se diluyó con cloruro de metileno (100 ml), se lavó con citrato de sodio 0,25 M y salmuera. La eliminación del disolvente produjo 0,835 g de producto aceitoso amarillo. Tiempo de ret. de HPLC: tiempo: 2,80 min., (99% de pureza). El espectro de masas por electrospray mostró picos a m/e 1478 (M+H), m/e 1500,6 (M+Na), m/e 1476,5 (MH), m/e 1590,5 (M+TFA), consistentes con la estructura.

40

45 [0184] 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 h. El tratamiento extractivo, que incluyó lavado con EDTA 0,1 M (10 ml), y cromatografía flash, produjo 0,891 g en forma de espuma amarilla. (rendimiento = 93 %), tiempo de ret. de HPLC: 2,60 min. El espectro de masas por electrospray mostró picos a m/e 1753,3 (M+H), m/e 1751,6 (MH), 1864,5 (M+TFA), consistentes con la estructura. Finalmente, la desprotección del penúltimo intermedio (0,22 g) con una mezcla de ácido dicloroacético (0,3 ml) y anisol (0,03 ml) en cloruro de metileno (3 ml), seguida de precipitación con éter produjo 0,18 g (97 % de rendimiento) de CL2A-SN-38; (7) en el Esquema-3) como un polvo amarillo claro. Tiempo de ret. de HPLC: 1,88 min. El espectro de masas por electrospray mostró picos a m/e 1480,7 (M+H), 1478,5 (MH), consistentes con la estructura.

50

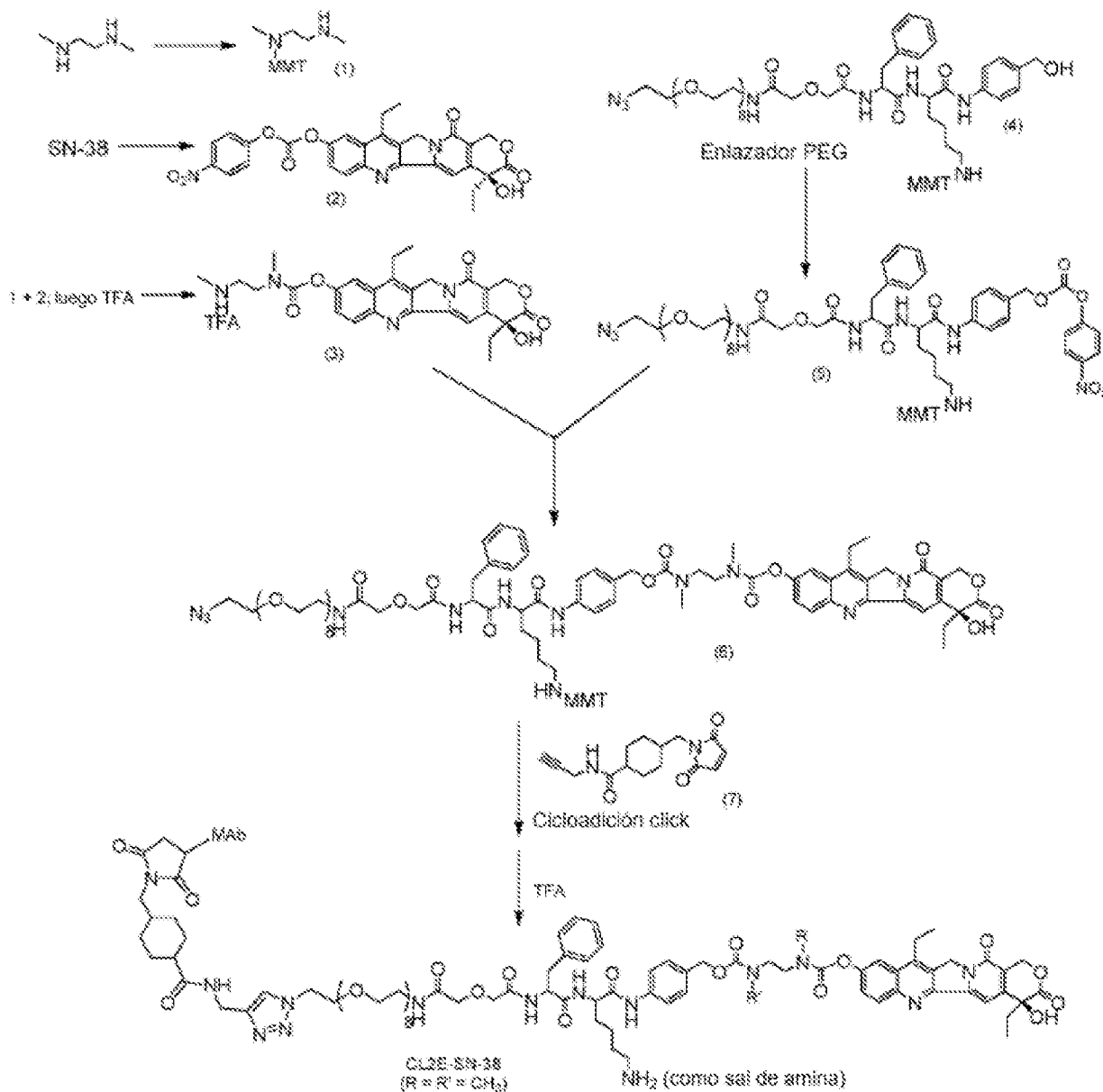
55

60

65

metileno en presencia de CuBr (0,007 g), DIEA (0,008 ml) y trifenilfosfina (0,012 g) durante 18 h. El procesamiento de la mezcla de reacción, que incluyó el tratamiento con EDTA 0,1 M, 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 electro spray mostró picos a m/e 2035,9 (M+Na⁺), m/e 2047,9 (M+Cl⁻), consistentes 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, produjo 0,051 g de producto, CL17-SN-38 (también denominado CL2E-SN-38), como un polvo amarillo claro (rendimiento = 69 %). Tiempo de ret. de HPLC: 1,95 min., ~99 % de pureza. El espectro de masas por electro spray mostró picos a m/e 1741,1 (M+H), 1775,5 (M+Cl⁻), consistentes con la estructura.

Esquema 4: Preparación de CL2E-SN-38



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

[0187] 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 de PBS, pH 7,4, que contenía 5,4 mM de EDTA, a 37 °C (baño) durante 45 min. El producto reducido se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño y/o diafiltración, y se intercambi6 el tamp6n en un tamp6n adecuado a pH 6,5. El contenido de tiol se determin6 mediante el ensayo de Ellman y se encontraba en el rango de 6,5 a 8,5 SH/IgG. Alternativamente, los anticuerpos se redujeron con Tris (2-carboximetil) fosfina (TCEP) en tamp6n de fosfato a un pH en el rango de 5-7, seguido de conjugaci6n *in situ*. El MAb reducido se hizo reaccionar con un exceso molar de ~10 a 15

veces de 'CL6-SN-38' del Ejemplo 1, o 'CL7-SN-38' del Ejemplo 2, o '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 CL2ESN-38 del Ejemplo 11 utilizando DMSO al 7-15 % v/v como codisolvente, e incubando durante 20 min a temperatura ambiente. El conjugado se purificó por SEC centrifugado, paso a través de una columna hidrófoba, y finalmente por ultrafiltración-diafiltración. El producto se analizó para SN-38 por absorbancia a 366 nm y se correlacionó con valores estándar, mientras que la concentración de proteína se dedujo de la absorbancia a 280 nm, corregida para el derrame de absorbancia de SN-38 a esta longitud de onda. De esta manera, se determinaron las proporciones de sustitución SN-38/MAb. Los conjugados purificados se almacenaron como formulaciones liofilizadas en viales de vidrio, tapados al vacío y almacenados en un congelador a -20 °C. Las proporciones de sustitución molar (MSR) de SN-38 obtenidas para algunos de estos conjugados, que estaban típicamente en el rango de 5 a 7, se muestran en la Tabla 2.

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

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

Ejemplo 15: Eficacias terapéuticas in vivo en modelos preclínicos de carcinoma pancreático o de colon humano

[0188] Ratones desnudos atímicos inmunodeprimidos (hembras), portadores de xenoinjertos subcutáneos de tumor pancreático o de colon humano, fueron tratados con conjugado CL2A-SN-38 específico o 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 CL2A-SN-38 específicos de los anticuerpos hRS7 (anti-EGP-1), hPAM4 (anti-mucina) y hMN-14 (anti-CEACAM5) mostraron mejores eficacias que el conjugado hA20-CL2A-SN-38 de control (anti-CD20) y el control sin tratamiento. De manera similar, en un modelo BXPC3 de cáncer de páncreas humano, el hRS7-CL2A-SN-38 específico mostró una mejor 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).

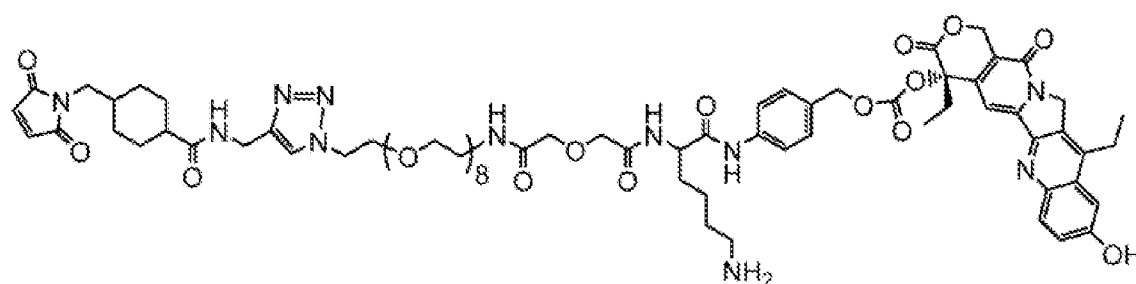
Ejemplo de referencia 16: Eliminación de la infección por VIH mediante tratamiento con un conjugado SN-38 de un MAb anti-gp120

[0189] Un MAb dirigido a la proteína de envoltura del VIH gp120, anticuerpo anti-gp 120 como P4/D10, se reduce utilizando las condiciones descritas en el Ejemplo 7, y el MAb reducido se hace reaccionar con un exceso molar de 20 veces 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 lleva a cabo un ensayo de inhibición del VIH *in vitro* con dicho conjugado utilizando varias mezclas de células T Jurkat no infectadas y células T Jurkat completamente infectadas con VIH (en proporciones de 99,8:0,2 a 95:5), y tratando con diluciones seriadas del conjugado, control de conjugado hRS7-CL7-SN₃₈ no específico, anticuerpo desnudo y suero VIH-negativo de 100 a 0,00001 µg/ml. Las células así tratadas se incuban en medio de cultivo RPMI 1640 a 37 °C durante siete días y luego se analizan para 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 prueba administrando a ratones células isólogas infectadas con VIH junto con conjugados SN-38 específicos y no específicos. Para ello, se transfieren por vía intraperitoneal esplenocitos murinos primarios infectados por el virus pseudotipo VIH-1/MuLV a grupos de ratones simultáneamente con la administración del inmunoconjugado. Las células peritoneales se recolectan 10 días después. Si bien se demuestra la presencia de VIH infeccioso en los ratones de control, no se detecta VIH infeccioso en los ratones tratados con 100 mg o menos de conjugado anti-gp120-SN-38. No se observa protección en los ratones tratados con conjugados de control.

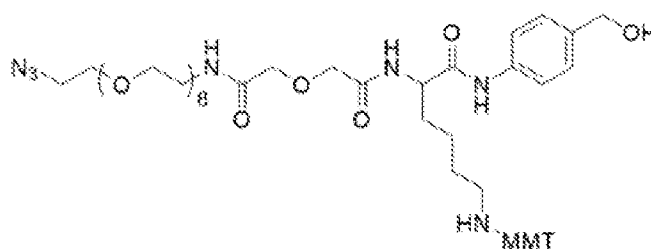
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar un compuesto CL2A-SN-38, que comprende:

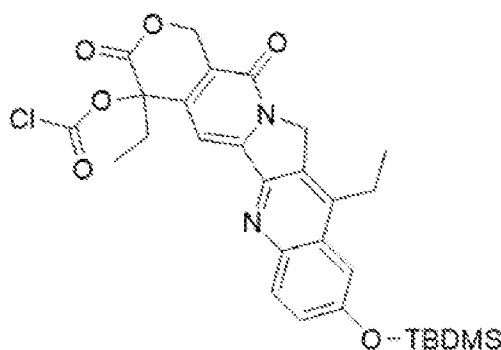
- (a) derivatizar un fármaco SN-38 con un primer enlazador, en donde el primer enlazador contiene una fracción reactiva que es capaz de combinarse con un segundo enlazador, una fracción PEG que comprende 8 subunidades monoméricas, un espaciador de aminoácido lisina entre el fármaco y el primer enlazador, y una fracción carbonato escindible intracelularmente, que es escindible por peptidasas intracelulares o escindible por el entorno de bajo pH de vesículas endosómicas y lisosómicas;
- (b) proporcionar un segundo enlazador, que contiene un grupo de acoplamiento de fracción de direccionamiento, que es un grupo maleimida, y además contiene un grupo reactivo capaz de reaccionar con el conjugado fármaco-primer enlazador; y
- (c) hacer reaccionar el segundo enlazador con el conjugado fármaco-primer enlazador mediante una reacción de cicloadición de acetileno-azida catalizada por iones de cobre (+1), para producir un compuesto que tiene una estructura representada por:



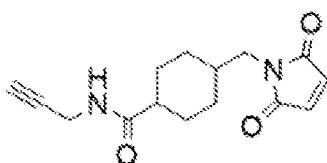
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que el primer enlazador tiene una estructura representada por:



el fármaco SN-38 para derivatización tiene una estructura representada por:



y el segundo enlazador tiene una estructura representada por:

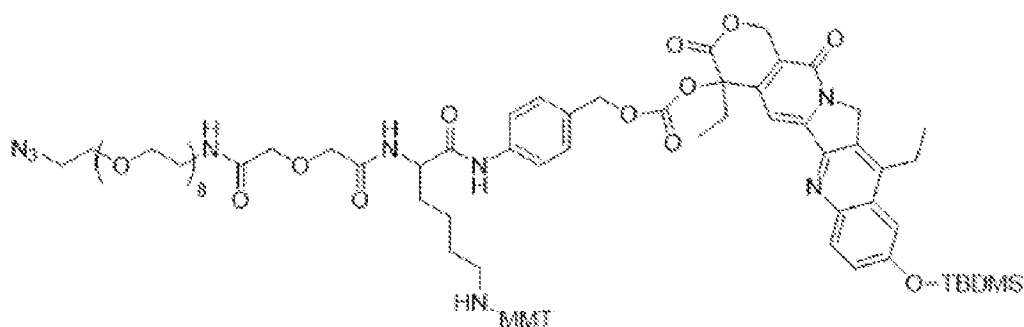


3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en el que el conjugado fármaco-primer enlazador tiene una estructura representada por:

5

10

15



4. El proceso de cualquier reivindicación precedente, que comprende, además:

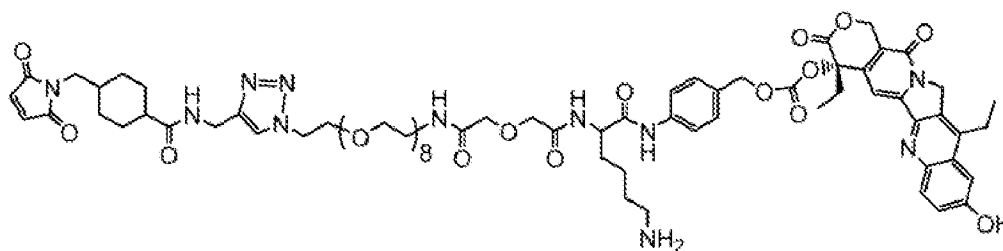
20

(d) conjugar el compuesto CL2A-SN-38 con una fracción de direccionamiento, opcionalmente en el que la fracción de direccionamiento es un anticuerpo o fragmento monoclonal.

5. Un compuesto CL2A-SN-38 que tiene una estructura representada por:

25

30



35

6. El CL2A-SN-38 de la reivindicación 5, en el que el compuesto CL2A-SN-38 comprende un residuo de lisina y el grupo amina épsilon de la lisina está presente como una sal de ácido dicloroacético.

7. El CL2A-SN-38 de la reivindicación 5 o 6, en el que la fracción maleimida de la molécula CL2A-SN-38 está conjugada con un grupo tiol en una proteína o péptido.

40

8. El CL2A-SN-38 de la reivindicación 7, en el que la proteína es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

9. El CL2A-SN-38 de la reivindicación 8, en el que el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ y scFv.

45

10. El CL2A-SN-38 de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo está unido a entre 6 y 12 copias de CL2A-SN-38.

11. El compuesto CL2A-SN-38 de la reivindicación 5 o 6, en el que el compuesto se produce mediante el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

50

12. El compuesto CL2A-SN-38 de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el compuesto se produce mediante el proceso de la reivindicación.

55

60

65

FIG. 1

Eficacia terapéutica de inmunocnjugados Mab-CL2A-SN38
 en ratones con tumor de capan-1
 (250 µg dos veces semanalmente x 4 sem.), n = 9-10

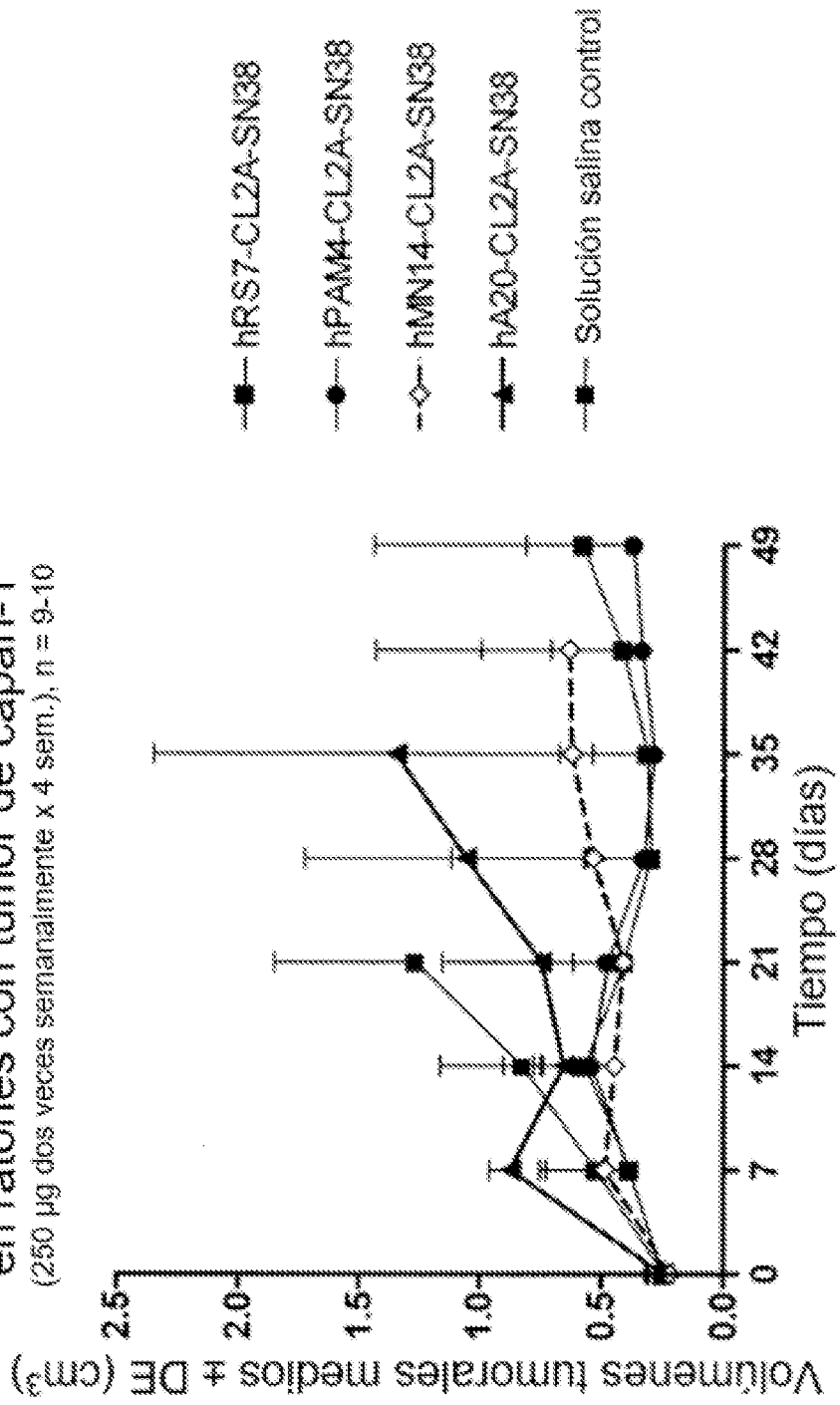


FIG. 2

Eficacia terapéutica de inmunocombinados MAb-CL2A-SN38
 en ratones con xenoinjerto de adenocarcinoma pancreático humano (BxPC-3)
 (500 µg dos veces semanalmente x 4 sem.), n = 10

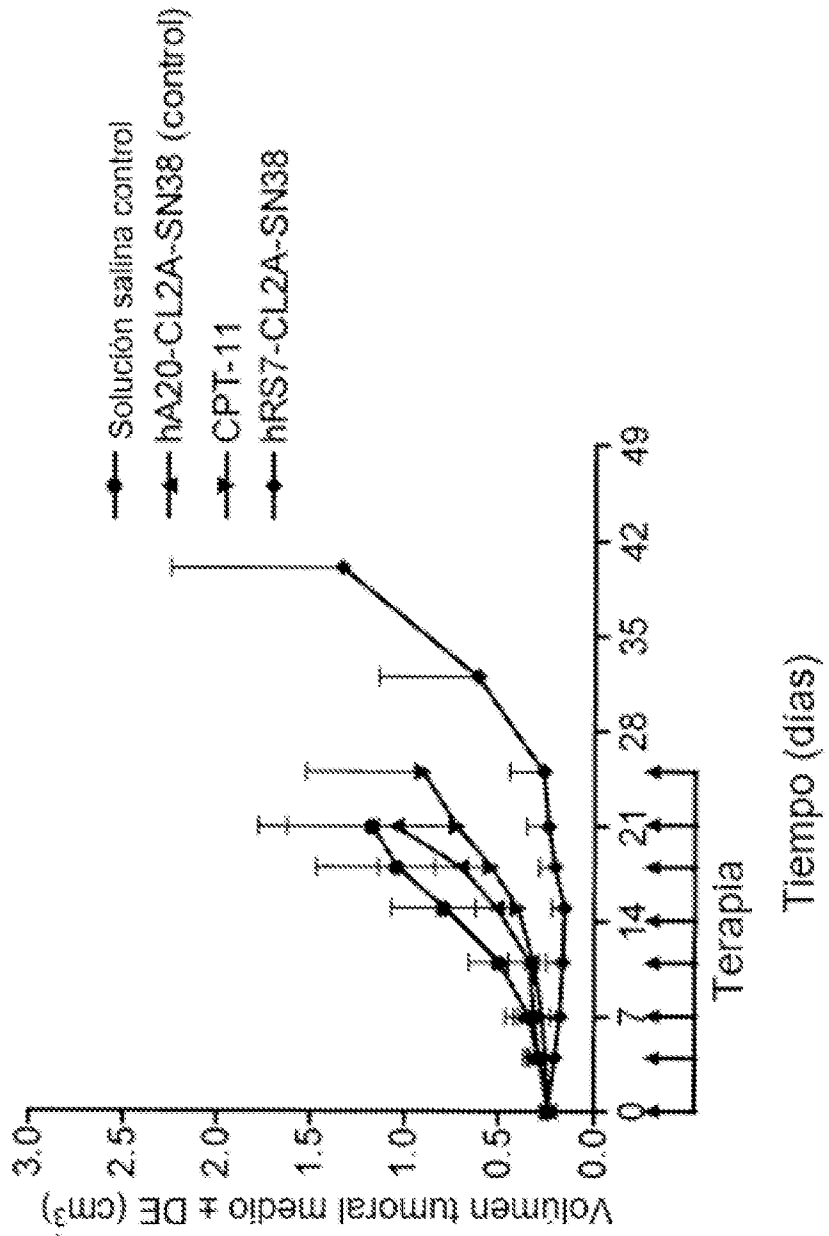


FIG. 3
Eficacia terapéutica de hMN-14-CL2A-SN38 en
Cáncer colorrectal humano experimental (LS 174T)
 (500 mg i.p. dos veces semanalmente x 2 sem.), n = 10

