

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 573**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/7088</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/68</b>	(2007.01)	<b>A61K 31/713</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)	<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/4745</b>	(2006.01)	<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/337</b>	(2006.01)	<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/4184</b>	(2006.01)	<b>A61N 5/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/4375</b>	(2006.01)	<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/454</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/513</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/675</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2014 PCT/US2014/034518**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15012904**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2014 E 14828674 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3024460**

54 Título: **Método para producir inmunocombinados de anticuerpo-SN-38 con un enlazador CL2A**

30 Prioridad:

**23.07.2013 US 201313948732**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.04.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOVINDAN, SERENGULAM V.;  
GALE, JONATHAN B.;  
HOLMAN, NICHOLAS J. y  
GOLDENBERG, DAVID M.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 819 573 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

Método para producir inmunocombinados de anticuerpo-SN-38 con un enlazador CL2A

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para producir un compuesto de maleimida que comprende SN-38, adecuado para conjugar SN-38 con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y un método para la preparación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo combinado con SN38.

**Antecedentes de la invención**

10 Durante muchos años, un objetivo de los científicos en el campo de la farmacoterapia dirigida específicamente, ha sido utilizar anticuerpos monoclonales (MAB, del inglés *monoclonal antibodies*) para el suministro específico de agentes tóxicos a cánceres humanos. Se han desarrollado combinados de MAB asociados a tumores y agentes tóxicos adecuados, pero han tenido un éxito ambivalente en la terapia del cáncer, y prácticamente ninguna aplicación en otras enfermedades, tales como enfermedades infecciosas y autoinmunitarias. El agente tóxico es más comúnmente un fármaco quimioterapéutico, aunque los radionucleidos emisores de partículas o las toxinas bacterianas o vegetales también se han combinado con los MAB, especialmente para la terapia del cáncer (Sharkey y Goldenberg, CA Cancer J Clin. julio-agosto de 2006; 56(4):226-243) y, más recientemente, con radioinmunoconbinados para la terapia preclínica de algunas enfermedades infecciosas (Dadachova y Casadevall, Q J Nucl Med Mol Imaging 2006;50(3):193-204).

15 Las ventajas de utilizar combinados de MAB-fármaco quimioterapéutico son que (a) el propio fármaco quimioterapéutico está bien definido estructuralmente; (b) el fármaco quimioterapéutico está ligado a la proteína de MAB utilizando químicas de combinación muy bien definidas, a menudo en sitios específicos alejados de las regiones de unión al antígeno de los MAB; (c) Los combinados de MAB-fármaco quimioterapéutico pueden fabricarse de manera más reproducible que los combinados químicos que implican los MAB y las toxinas bacterianas o vegetales, y como tales son más susceptibles de desarrollo comercial y aprobación reguladora; y (d) los combinados de MAB-fármaco quimioterapéutico presentan sistémicamente órdenes de magnitud menos tóxicas que los combinados de MAB radionucleidos.

20 Los primeros trabajos sobre combinados de 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 combinado de proteína-fármaco sea un compuesto terapéutico útil. Trouet *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:626-629 (1982)) mostraron la ventaja de utilizar enlazadores peptídicos específicos, entre el fármaco y la fracción de anticuerpo, que se escinden lisosómicamente para liberar el fármaco intacto. En particular, se desarrollaron combinados de MAB-fármaco quimioterapéutico preparados utilizando enlazadores escindibles con ácidos suaves, como los que contienen una hidrazona, basándose en la observación de que el pH dentro de los tumores era a menudo más bajo que el pH fisiológico normal (Willner *et al.*, Patente de Estados Unidos 5 708 146; Trail *et al.* (Science 261:212-215 (1993)). El primer combinado de MAB-fármaco aprobado, gemtuzumab ozogamicina, incorporó un enlace de hidrazona lábil a ácidos 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 combinados de MAB-fármaco quimioterapéutico se produjeron con enlaces disulfuro impedidos reductivamente lábiles entre los fármacos quimioterapéuticos y el MAB (Liu *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 93: 8618-8623 (1996)).

25 Incluso otro enlazador escindible implica espaciadores dipeptídicos lábiles de catepsina B, tales como Phe-Lys o Val-Cit, similares a los separadores peptídicos lisosómicamente lábiles de Trouet *et al.* que contienen de uno a cuatro aminoácidos, que adicionalmente incorporó un espaciador plegable entre el fármaco y el dipéptido (Dubowchik, *et al.*, Bioconjugate Chem. 13:855-869 (2002); Firestone *et al.*, Patente de Estados Unidos 6 214 345 B1; Dronina *et al.*, Nat Biotechnol. 21: 778-784 (2003)). Los últimos enfoques también se utilizaron en la preparación de un inmunocombinado de camptotecina (Walker *et al.*, Bioorg Med Chem Lett. 12:217-219 (2002)). Otra fracción escindible que se ha explorado es un enlace éster incorporado en el enlazador entre el anticuerpo y el fármaco quimioterapéutico. Gillimard y Saragovi han descubierto que cuando un éster de paclitaxel se combina con el MAB p75 anti-rata, MC192, o con el MAB TrkA antihumano, 5C3, se encontró que el combinado exhibía toxicidad específica hacia la diana. Gillimard y Saragovi, Cancer Res. 61:694-699 (2001).

30 Las nociones actuales de diseño de combinado de anticuerpo-fármaco enfatizan el uso de fármacos ultratóxicos unidos a anticuerpos utilizando enlaces estables que se escinden solo intracelularmente. Este enfoque se ha utilizado para diseñar combinados de fármacos ultratóxicos, tales como caliqueamicina, monometilauristatina-E (MMAE) y maitansinoides. Aunque una unión muy estable con los MAB (anticuerpos monoclonales) da como resultado estabilidad en la circulación, los combinados también se procesan en el hígado, bazo y riñón, liberando así los fármacos tóxicos en esos órganos y reduciendo posiblemente la ventana terapéutica en las aplicaciones de tratamiento de enfermedades. Aunque la reciente aprobación reguladora de ADCETRIS® (brentuximab vedotin) para el linfoma de Hodgkin y de KADCYLA® (adotrastuzumab emtansine) para el cáncer de mama resistente es alentadora, la falta de eficacia terapéutica en la dosis máxima administrable de combinado de caliqueamicina en el linfoma no Hodgkin y su posterior suspensión, así como la retirada del mercado de gemtuzumab ozogamicina para la LMA apuntan a las limitaciones del uso de ultratóxicos en los ADC.

Los conjugados preparados de acuerdo con la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, poseen mayor eficacia que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos no conjugados o "desnudos", aunque dichas fracciones de anticuerpos no conjugados se han utilizado en situaciones específicas. En el cáncer, por ejemplo, los anticuerpos desnudos han llegado a desempeñar un papel en el tratamiento de los linfomas (CAMPATH® y RITUXAN®), cánceres colorrectales y otros (ERBITUX® y AVASTIN®), cáncer de mama (HERECEPTIN®), así como un gran número ahora en desarrollo clínico (p. ej., epratuzumab, veltuzumab, milatuzumab). En la mayoría de estos casos, el uso clínico ha implicado la combinación de estos anticuerpos, desnudos o no conjugados, con otras terapias, tales como quimioterapia o radioterapia.

Se ha descrito el uso de enlazadores de CL2A, tales como SN-38, para unir fármacos terapéuticos con fracciones de anticuerpos (p. ej. patentes de Estados Unidos n.º 7 999 083 y 8 080 250). Sin embargo, se requieren métodos más eficaces para preparar y utilizar CL2A y conjugados de MAb-CL2A-SN-38, incluyendo pautas de dosificación optimizadas que dan como resultado una eficacia máxima y una toxicidad mínima, así como una producción eficaz a gran escala de CL2A-SN-38 y de conjugados de anticuerpo-CL2A-SN-38.

El documento US 2012/0082617 A1 está relacionado con conjugados terapéuticos con una capacidad mejorada 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 fracción terapéutica, y un método para preparar y utilizar dichos conjugados.

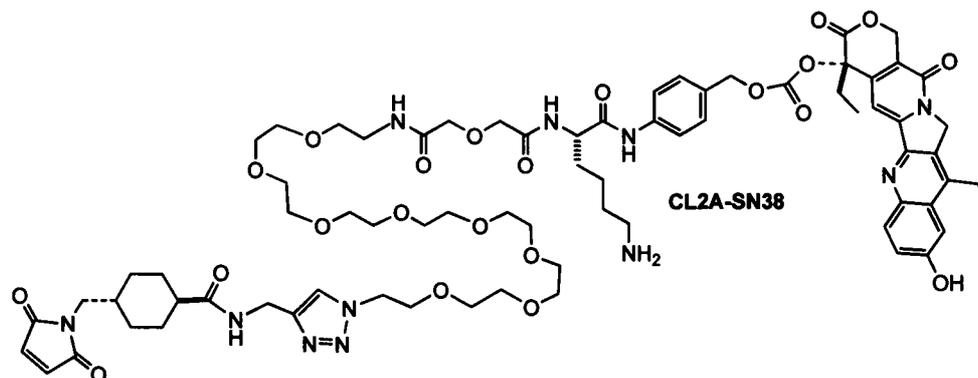
GlobeNewswire informa en su sitio web el 30 de mayo de 2013 que Immunomedics presenta el progreso clínico de los programas de conjugado anticuerpo-fármaco en la Conferencia de la Asociación de Biotecnología de Nueva York ([URL:https://globenewswire.com/news-release/2013/05/30/550792/10034487/en/Immunomedics-Presents-Clinical-Progress-of-Antibody-Drug-Coniugate-Programs-at-Conference-of-New-York-Biotechnology-Association.html](https://globenewswire.com/news-release/2013/05/30/550792/10034487/en/Immunomedics-Presents-Clinical-Progress-of-Antibody-Drug-Coniugate-Programs-at-Conference-of-New-York-Biotechnology-Association.html))

La entrada NCT01631552 en el sitio web "ClinicalTrials.gov archive", informa sobre un estudio en Fase I de aumento de dosis de conjugado de anticuerpo-fármaco IMMU-132 en pacientes con cáncer epitelial avanzado, actualizado el 28 de junio de 2012 ([URL: https://clinicaltrials.gov/archive](https://clinicaltrials.gov/archive) (NCT01631552/2012\_06\_28)).

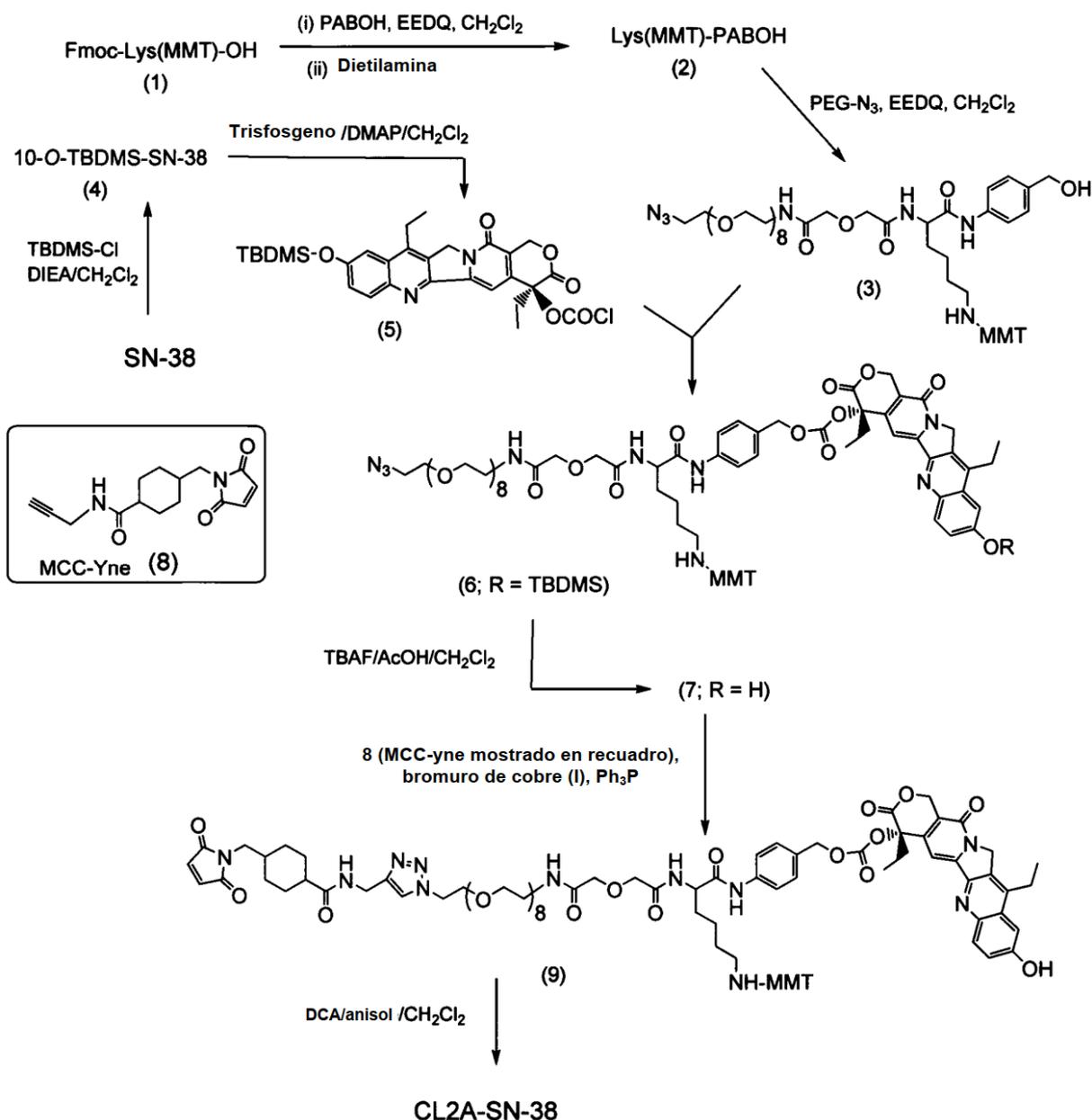
## Compendio de la invención

El problema que subyace a la presente invención se resuelve mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

De manera más específica, el problema que subyace a la presente invención se resuelve en un primer aspecto mediante un método para producir un compuesto, CL2A-SN-38, de la estructura



que comprende realizar un esquema de reacción como el que se muestra:



En una realización del primer aspecto, el método comprende hacer reaccionar SN-38 con cloruro de terc-butildimetilsililo (TBDMS-Cl) para producir 10-O-TBDMS-SN-38 (producto intermedio 4), en donde la reacción se lleva a cabo en disolvente diclorometano.

- 5 En una realización del primer aspecto, el método comprende además hacer reaccionar 10-O-TBDMS-SN-38 (producto intermedio 4) con trifosgeno y DMAP para producir 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-cloroformiato (producto intermedio reactivo 5), en donde la reacción se realiza añadiendo trifosgeno a una mezcla de reacción de diclorometano que contiene el producto intermedio 4, y el trifosgeno se añade en partes, para reducir la reacción exotérmica durante la fabricación a gran escala y mantener un rendimiento de reacción elevado.

- 10 En una realización del primer aspecto, el método comprende además precipitar Lys(MMT)-PABOH (producto intermedio 2) con heptano.

En una realización del primer aspecto, el método comprende además hacer reaccionar azido-PEG-Lys(MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38 (producto intermedio 7) con MCC-Yne (producto intermedio 8) mediante una reacción de cicloadición catalizada con cobre para producir MCC-PEG-Lys(MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38 (producto intermedio 9), en donde la reacción se lleva a cabo durante 14 h para mejorar el rendimiento del producto.

- 15 En una realización del primer aspecto, el producto intermedio 9 se purifica primero mediante cromatografía en gel de sílice, seguido de extracción con EDTA para eliminar el cobre.

El problema que subyace a la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante un método para la fabricación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugado con SN38, en donde el método comprende hacer reaccionar una fracción de maleimida de CL2A-SN38 preparada mediante un método según el primer aspecto, incluyendo cualquier realización del mismo, con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, para fabricar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugado con SN38.

En una realización del segundo aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a entre 1 y 12 copias de CL2A-SN38.

En una realización del segundo aspecto, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en LL1 (anti-CD74), LL2 (anti-CD22), RFB4 (anti-CD22), RS7 (anti-EGP-1), PAM4 (anti-MUC5AC), KC4 (anti-mucina), A19 (anti-CD 19), A20 (anti-CD20), MN-14 (anti-CEACAM5), MN-15 (anti-CEACAM6), MN-3 (anti-CEACAM6), R1 (anti-IGF-1R), Mu-9 (anti-CSAp), Immu 31 (anti-AFP), CC49 (anti-TAG-72), J591 (anti-PSMA), HuJ591 (anti-PSMA), AB-PG1-XG 1-026 (dímero anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (anti-anhidrasa carbónica IX) y hL243 (anti-HLA-DR).

En una realización del segundo aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en anhidrasa carbónica IX, alfafetoproteína (AFP),  $\alpha$ -actinina-4, ART-4, B7, Ba 733, BAGE, antígeno BrE3, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8/m, CCL19, CCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD132, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1 $\alpha$ , antígeno p específico de colon (CSAp), CEACAM5, CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, receptor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, GAGE, gp100, GRO- $\beta$ , H2B, H3, H4, HLA-DR, HM1.24, gonadotropina coriónica humana (HCG), HER2/neu, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2, Ia, IGF-R, IFN- $\gamma$ , IFN-a, IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ , 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-23, IL-25, factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, factor inhibidor de la migración de macrófagos (FIM), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, FIM, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, PD-1, PD-L1, receptor de PD-1, factor de crecimiento placentario, p53, PLAGL2, fosfatasa ácida prostática, PSA, PRAME, PSMA, PIGF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, S100, survivina, survivina-2B, TAC, TAG-72, tenascina, receptores de TRAIL, TNF-a, antígeno Tn, antígeno de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, VEGFR, fibronectina ED-B, WT-1, antígeno 17-1A, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, bcl-2, bcl-6, Kras, y un producto oncogénico.

La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, proporciona conjugados de anticuerpos de SN-38 que tienen toxicidades nanomolares *in vitro*, en comparación con las toxicidades subnanomolares a picomolares de los agentes quimioterapéuticos ultratóxicos como la caliqueamicina, maitansinoides o MMAE. El uso de fármacos que no son ultratóxicos, permite el uso de enlazadores de anticuerpo-fármaco que no requieren internalización celular para la liberación de fármacos libres, sino que permiten cierta liberación extracelular del fármaco. Con el enlazador CL2A que se describe a continuación, el 50 % del fármaco conjugado se libera en 24 horas, aumentando así la biodisponibilidad del fármaco liberándolo tanto extracelularmente como intracelularmente. Además, el uso de fármacos relativamente no tóxicos permite la administración de dosis más altas de los ADC (siglas del inglés *antibody-drug conjugate*, conjugado de anticuerpo-fármaco), lo que conduce a obtener mejores efectos terapéuticos.

La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, soluciona una necesidad no satisfecha en la técnica al proporcionar métodos mejorados para preparar inmunoconjugados de SN-38-anticuerpo. Los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, proporcionan inmunoconjugados que son útiles para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones que son resistentes o menos sensibles a otras formas de terapia, y pueden incluir enfermedades contra las que pueden desarrollarse, o están disponibles o se conocen, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno adecuados para el direccionamiento selectivo. Las enfermedades o afecciones preferidas que pueden tratarse con los inmunoconjugados en cuestión incluyen, por ejemplo, cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad de disfunción inmunitaria o enfermedades causadas por organismos infecciosos.

El anticuerpo puede ser de varios isotipos, preferiblemente IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, comprendiendo más preferiblemente secuencias de la región constante y bisagra de la IgG1 humana. El anticuerpo o fragmento del mismo, puede ser un anticuerpo quimérico, humanizado o completamente humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como hemianticuerpos de IgG4, como describen van der Neut Kofschoten *et al.* (Science 2007; 317:1554-1557), o anticuerpos de un solo dominio (p. ej., nanocuerpos) disponibles en el comercio (p. ej., ABLYNX®, Gante, Bélgica). Más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo puede diseñarse o seleccionarse para que comprenda secuencias de la región constante humana que pertenezcan a alotipos específicos, que pueden dar como resultado una inmunogenicidad reducida cuando el inmunoconjugado se administra a un sujeto humano. Los alotipos preferidos para la administración incluyen un alotipo no G1m1 (nG1m1), tal como G1m3, G1m3,1, G1m3,2 o G1m3,1,2. Más preferiblemente, el alotipo se selecciona del grupo que consiste en los alotipos nG1m1, G1m3, nG1m1,2 y Km3.

Los anticuerpos de utilidad pueden unirse a cualquier antígeno asociado a una enfermedad conocido en la técnica.

- 5 Cuando la patología es cáncer, por ejemplo, en la técnica se conocen muchos antígenos expresados por las células tumorales o asociados de alguna manera con ellas, incluyendo, pero sin limitación, anhidrasa carbónica IX, alfafetoproteína (AFP),  $\alpha$ -actinina-4, A3, antígeno específico para el anticuerpo A33, ART-4, B7, Ba 733, BAGE, antígeno BrE3, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8/m, CCL19, CCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD132, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1 $\alpha$ , antígeno p específico de colon (CSAp), CEACAM5, CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, receptor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, GAGE, gp100, GRO- $\beta$ , HLA-DR, HM1.24, gonadotropina coriónica humana (HCG) y sus subunidades, HER2/neu, histona H2B, histona H3, histona H4, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2, Ia, IGF-1R, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ , 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-23, IL-25, factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), antígeno KC4, antígeno KS-1, KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, factor inhibidor de la migración de macrófagos (FIM), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, FIM, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, antígeno PAM4, mucina de cáncer pancreático, PD-1, PD-L1, receptor de PD-1, factor de crecimiento placentario, p53, PLAGL2, fosfatasa ácida prostática, PSA, PRAME, PSMA, PIGF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, S100, survivina, survivina-2B, TAC, TAG-72, tenascina, receptores de TRAIL, TNF- $\alpha$ , antígeno Tn, antígenos de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, VEGFR, fibronectina ED-B, WT-1, antígeno 17-1A, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, un marcador de angiogénesis, bcl-2, bcl-6, Kras, un marcador oncogénico y un producto oncogénico (véase, p. ej., Sensi *et al.*, Clin Cancer Res 2006, 12:5023-32; Parmiani *et al.*, J Immunol 2007, 178:1975-79; Novellino *et al.* Cancer Immunol Immunother 2005, 54:187-207). Preferiblemente, el anticuerpo se une a AFP, CEACAM5, CEACAM6, CSAp, EGP-1 (TROP-2), AFP, MUC5ac, antígeno PAM4, CD74, CD19, CD20, CD22 o HLA-DR.
- 25 Como ejemplos de anticuerpos que pueden utilizarse se incluyen, pero sin limitación, hR1 (anti-IGF-1R, solicitud de patente de Estados Unidos N.º de serie 12/722 645, presentada el 12/03/10), hPAM4 (anti-MUC5ac, patente de Estados Unidos N.º 7 282 567), hA20 (anti-CD20, patente de Estados Unidos N.º 7 251 164), hA19 (anti-CD19, patente de Estados Unidos N.º 7 109 304), hIMMU31 (anti-AFP, patente de Estados Unidos N.º 7 300 655), hLL1 (anti-CD74, patente de Estados Unidos N.º 7 312 318), hLL2 (anti-CD22, patente de Estados Unidos N.º 7 074 403), hRFB4 (anti-CD22, solicitud de patente provisional de Estados Unidos N.º de serie 61/944 295, presentada el 25/2/14), hMu-9 (anti-CSAp, patente de Estados Unidos N.º 7 387 773), hL243 (anti-HLA-DR, patente de Estados Unidos N.º 7 612 180), hMN-14 (anti-CEACAM5, patente de Estados Unidos N.º 6 676 924), hMN-15 (anti-CEACAM6, patente de Estados Unidos N.º 7,541,440), hRS7 (anti-EGP-1, patente de Estados Unidos N.º 7 238 785), hMN-3 (anti-CEACAM6, patente de Estados Unidos N.º 7 541 440), Ab124 y Ab125 (anti-CXCR4, patente de Estados Unidos N.º 7 138 496). Más preferiblemente, el anticuerpo es IMMU-31 (anti-AFP), hRS7 (anti-TROP-2), hMN-14 (anti-CEACAM5), hMN-3 (anti-CEACAM6), hMN-15 (anti-CEACAM6), hLL1 (anti-CD74), hLL2 (anti-CD22), hL243 o IMMU-114 (anti-HLA-DR), hA19 (anti-CD19) o hA20 (anti-CD20). Como se emplea en esta memoria, los términos epratuzumab y hLL2 son intercambiables, al igual que los términos veltuzumab y hA20, hL243g4P, hL243gamma4P e IMMU-114.
- 40 Los anticuerpos de utilidad alternativos incluyen, pero sin limitación, abciximab (anti-glicoproteína IIb/IIIa), alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab (anti-CD20), panitumumab (anti-EGFR), rituximab (anti-CD20), tositumomab (anti-CD20), trastuzumab (anti-ErbB2), lambrolizumab (anti-receptor de PD-1), nivolumab (anti-receptor de PD-1), ipilimumab (anti-CTLA-4), abagovomab (anti-CA-125), adecatumumab (anti-EpCAM), atlizumab (anti-receptor de IL-6), benralizumab (anti-CD 125), obinutuzumab (GA101, anti-CD20), CC49 (anti-TAG-72), AB-PG1-XG1-026 (anti-PSMA, solicitud de patente de Estados Unidos 11/983 372, depositado en la ATCC como PTA-4405 y PTA-4406), D2/B (anti-PSMA, documento WO 2009/130575), tocilizumab (anti-receptor de IL-6), basiliximab (anti-CD25), daclizumab (anti-CD25), efalizumab (anti-CD11a), GA101 (anti-CD20; Glycart Roche), muromonab-CD3 (anti-receptor de CD3), natalizumab (anti-integrina  $\alpha$ 4), omalizumab (anti-IgE); anticuerpos anti-TNF- $\alpha$ , tales como CDP571 (Ofei *et al.*, 2011, Diabetes 45:881-85), MTNFAl, M2TNFAl, M3TNFAl, M3TNFAB1, M302B, M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL), infliximab (Centocor, Malvern, PA), certolizumab pegol (UCB, Bruselas, Belgica), anti-CD40L (UCB, Bruselas, Belgica), adalimumab (Abbott, Abbott Park, IL), Benlysta (Human Genome Sciences); anticuerpos para la terapia de la enfermedad de Alzheimer, tal como Alz 50 (Ksiezak-Reding *et al.*, 1987, J Biol Chem 263:7943-47), gantenerumab, solanezumab e infliximab; anticuerpos anti-fibrina como 59D8, T2G1s, MH1; anticuerpos anti-CD38, tales como MOR03087 (MorphoSys AG), MOR202 (Celgene), HuMax-CD38 (Genmab) o daratumumab (Johnson & Johnson); anticuerpos anti-VIH, tales como P4/D10 (patente de Estados Unidos 8 333 971), Ab 75, Ab 76, Ab 77 (Paulik *et al.*, 1999, Biochem Pharmacol 58: 1781-90), así como los anticuerpos anti-VIH descritos y comercializados por Polymun (Viena, Austria), que también se describen en la patente de Estados Unidos 5 831 034, patente de Estados Unidos 5 911 989 y Vcelar *et al.*, AIDS 2007; 21(16):2161-2170 y Joos *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50(5):1773-9; y anticuerpos contra patógenos tales como CR6261 (antigripal), exbirivumab (anti-hepatitis B), felvizumab (anti-virus respiratorio sincicial), foravirumab (anti-virus de la rabia), motavizumab (anti-virus respiratorio sincicial), palivizumab (anti-virus respiratorio sincicial), panobacumab (anti-*Pseudomonas*), rafivirumab (anti-virus de la rabia), regavirumab (anti-citomegalovirus), sevirumab (anti-citomegalovirus), tivirumab (anti-hepatitis B) y urtoxazumab (anti-*E. coli*).
- 60

Preferiblemente, la fracción de anticuerpo se une a al menos a una fracción de fármaco, más preferiblemente a de 1 a aproximadamente 5 fracciones de fármaco, de manera alternativa a aproximadamente de 7 a 12 fracciones de fármaco. En diversas realizaciones, la fracción de anticuerpo puede unirse a 4 o 6 fracciones de fármaco, o a 5 o menos fracciones de fármaco. El número de fracciones de fármaco por fracción de anticuerpo puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o mayor.

Un ejemplo de un derivado de CPT soluble en agua es CPT-11. Se dispone de muchos datos clínicos sobre la farmacología de CPT-11 y de su conversión *in vivo* a 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 fuerte que CPT-11. En realizaciones preferidas específicas, el inmunoconjugado puede ser un conjugado de hMN-14-SN-38, hMN-3-SN-38, hMN-15-SN-38, hIMMU-31-SN-38, hRS7-SN-38, hR1-SN-38, hA20-SN-38, hPAM4-SN-38, hL243-SN-38, hLL1-SN-38, hRFB4-SN-38, hMu-9-SN-38 o hLL2-SN-38. De acuerdo con la invención, tal como se define en las reivindicaciones, para conjugar el SN-38 con la fracción de anticuerpo se utiliza un enlazador de CL2A.

Los inmunoconjugados preparados mediante los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, pueden utilizarse en el tratamiento de un cáncer, incluyendo pero sin limitación, linfomas no Hodgkin, leucemias linfocíticas agudas y crónicas de células B, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma agudo de células B grandes, tricoleucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfomas y leucemias de células T, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, carcinomas, melanomas, sarcomas, gliomas, cánceres de hueso y piel. Los carcinomas pueden incluir carcinomas de la cavidad bucal, esófago, tubo digestivo, tracto pulmonar, pulmón, estómago, colon, mama, ovario, próstata, útero, endometrio, cuello uterino, vejiga urinaria, páncreas, hueso, cerebro, tejido conectivo, hígado, vesícula biliar, vejiga urinaria, riñón, piel, sistema nervioso central y testículos.

Como ejemplos de enfermedades autoinmunitarias o disfunciones inmunitarias que posiblemente pueden tratarse con los inmunoconjugados en cuestión, se incluyen las siguientes, trombocitopenia inmunitaria aguda, trombocitopenia inmunitaria crónica, dermatomiositis, corea de Sydenham, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, diabetes mellitus (p. ej., diabetes juvenil), púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nodular, arteritis de Takayasu, vasculitis asociadas a ANCA, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía por IgA, panarteritis nodular, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirototoxicosis, esclerodermia, hepatitis activa crónica, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis, alveolitis fibrosante, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), rechazo de trasplante de órganos, síndrome séptico, septicemia e inflamación.

Además, los inmunoconjugados preparados mediante los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, pueden utilizarse en el tratamiento de una enfermedad infecciosa, por ejemplo, enfermedades que implican infección por patógenos tales como bacterias, rickettsias, micoplasma, protozoos, hongos, virus, parásitos u otros agentes microbianos. Los ejemplos incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que causa el SIDA, *Mycobacterium* de tuberculosis, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemofilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, virus del Nilo Occidental, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, virus de la rabia, virus de la gripe, citomegalovirus, virus del herpes simple I, virus del herpes simple II, virus parvovírico en suero humano, virus respiratorio sincicial, virus de la varicela zoster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del sarampión, adenovirus, virus de la leucemia humana de células T, virus de Epstein Barr, virus de la leucemia murina, virus de las paperas, virus de la estomatitis vesicular, virus sindbis, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus verrucoso, virus de la lengua azul, virus de Sendai, virus de la leucemia felina, reo virus, virus de la polio, virus de simio 40, virus del tumor mamario del ratón, virus del dengue, virus de la rubéola, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rhodesiensei*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Babesia bovis*, *Elmeria tenella*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania tropica*, *Trichinella spiralis*, *Theileria parva*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti*, *Mycoplasma arthritis*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laylawii*, *M. salivarium* y *M. pneumoniae*. En Casadevall, Clin Immunol 1999; 93(1):5-15, se incluye una revisión que enumera anticuerpos contra organismos infecciosos (anticuerpos antitoxina y antivíricos), así como otras dianas.

En el tratamiento del cáncer, los conjugados farmacológicos pueden utilizarse en combinación con cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia con anticuerpos desnudos, radioinmunoterapia, inmunomoduladores, vacunas y similares. En el tratamiento de otras enfermedades susceptibles a fracciones de anticuerpos, se prefieren combinaciones similares, tales como enfermedades autoinmunitarias. 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 autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, vasculitis, así como diabetes de tipo I (diabetes juvenil). Estas

terapias combinadas pueden permitir que se administren dosis más bajas de cada terapia en dichas combinaciones, reduciendo así algunos efectos secundarios graves y reduciendo posiblemente los ciclos de terapia necesarios.

5 En enfermedades infecciosas, los inmunoconjugados de fármacos se pueden combinar con otros fármacos terapéuticos, inmunomoduladores, MAb desnudos o vacunas (p. ej., MAb contra la hepatitis, VIH, o virus del papiloma, o vacunas basadas en inmunógenos de estos virus, o inhibidores de cinasa, tales como en la hepatitis B). En la técnica se conocen anticuerpos y vacunas basados en antígenos contra estos y otros patógenos víricos y, en algunos casos, ya en uso comercial. El desarrollo de anticuerpos monoclonales antiinfecciosos ha sido revisado recientemente por Reichert y Dewitz (Nat Rev Drug Discovery 2006; 5: 191-195), que resumen los patógenos prioritarios contra los cuales se ha seguido la terapia con anticuerpos desnudos, dando como resultado solo 2 patógenos contra los que los anticuerpos se encuentran en ensayos clínicos en fase III o se están comercializando (virus respiratorio sincicial y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina), con otros 25 en estudios clínicos y 20 retirados durante el estudio clínico. Para terapia combinada, se describe el uso de radioinmunoterapia para el tratamiento de organismos infecciosos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 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 solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20020136690 y 20030103982.

10 La dosis óptima preferida de inmunoconjugados puede incluir una dosis de entre 3 mg/kg y 18 mg/kg, preferiblemente administrada semanalmente, dos veces a la semana, cada dos semanas o cada tres semanas. La pauta de dosificación óptima puede incluir ciclos de tratamiento de dos semanas consecutivas de terapia seguido de una, dos, tres o cuatro semanas de descanso, o semanas alternas de terapia y descanso, o una semana de terapia seguida de dos, tres o cuatro semanas de descanso, o tres semanas de terapia seguidas de una, dos, tres o cuatro semanas de descanso, o cuatro semanas de terapia seguidas de una, dos, tres o cuatro semanas de descanso, o cinco semanas de terapia seguidas de una, dos, tres, cuatro o cinco semanas de descanso, o administración una vez cada dos semanas, cada tres semanas o una vez al mes. El tratamiento puede ampliarse a cualquier número de ciclos, preferiblemente al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14 o al menos 16 ciclos. La dosis puede ser de hasta 24 mg/kg. Como ejemplos de dosis útiles se incluyen las siguientes 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 22 mg/kg y 24 mg/kg. Las dosis preferidas son de 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 16 o 18 mg/kg. El experto familiarizado con la técnica se percatará de que al seleccionar una dosis óptima de inmunoconjugado, pueden tenerse en cuenta diversos factores, tales como la edad, el estado de salud general, la función o el peso de un órgano específico, así como los efectos de la terapia anterior en sistemas de órganos específicos (p. ej., la médula ósea), y que la dosis y/o la frecuencia de la administración pueden aumentarse o reducirse durante el ciclo de la terapia. La dosis puede repetirse según sea necesario, observándose indicios de reducción del tumor después de tan solo 4 a 8 dosis. Las dosis optimizadas y los programas de administración descritos en la presente memoria muestran una eficacia superior inesperada y una toxicidad reducida en sujetos humanos, que no podría haberse predicho a partir de estudios con modelos animales. Sorprendentemente, la eficacia superior permite el tratamiento de tumores que anteriormente se descubrió que eran resistentes a una o más terapias estándar contra el cáncer, incluido el compuesto precursor, CPT-11, del cual procede SN-38 *in vivo*.

35 Un resultado sorprendente con los inmunoconjugados preparados mediante los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, es la inesperada tolerabilidad de altas dosis de conjugado de anticuerpo-fármaco, incluso con infusiones repetidas, observándose sólo un grado relativamente bajo de toxicidad en forma de náuseas, vómitos y diarrea, así como erupción cutánea o neutropenia tratables. Otro resultado sorprendente es la ausencia de acumulación del conjugado de anticuerpo-fármaco, a diferencia de otros productos que han conjugado SN-38 con albúmina, PEG u otros transportadores. La ausencia de acumulación se asocia a una mejor tolerabilidad y ausencia de toxicidad grave incluso después de dosis repetidas o aumentadas. Estos sorprendentes resultados permiten optimizar la dosificación y el programa de administración, con eficacias inesperadamente altas y bajas toxicidades. En personas con cánceres anteriormente resistentes, se proporciona una reducción del tamaño de los tumores (medido según el diámetro más largo) del 15 % o más, preferiblemente del 20 % o más, preferiblemente del 30 % o más, más preferiblemente del 40 % o más. El experto familiarizado con la técnica se percatará de que el tamaño del tumor puede medirse mediante una variedad de técnicas diferentes, tal como el volumen tumoral total, el tamaño tumoral máximo en cualquier dimensión o una combinación de medidas de tamaño en varias dimensiones. Esto puede ser con procedimientos radiológicos estándar, tal como tomografía computarizada, ecografía y/o tomografía por emisión de positrones. Los medios para medir el tamaño son menos importantes que observar una tendencia a la disminución del tamaño del tumor con el tratamiento de inmunoconjugado, preferiblemente dando como resultado la eliminación del tumor.

40 Aunque el inmunoconjugado se puede administrar como una inyección periódica en embolada, el inmunoconjugado puede administrarse de manera alternativa mediante infusión continua de conjugados de anticuerpo-fármaco. Para aumentar la  $C_{m\acute{a}x}$  y prolongar la PK (del inglés *pharmacokinetics*, farmacocinética) del inmunoconjugado en la sangre, se puede administrar una infusión continua, por ejemplo, mediante un catéter permanente. En la técnica se conocen dispositivos de este tipo, tales como los catéteres HICKMAN®, BROVLAC® o PORT-A-CATH® (véase, p. ej., Skolnik *et al.*, Ther Drug Monit 32: 741-48, 2010) y se puede utilizar cualquier catéter permanente de este tipo conocido. En la técnica también se conoce una variedad de bombas de infusión continua y puede utilizarse cualquier bomba de infusión conocida. El intervalo de dosificación para la infusión continua puede estar entre 0,1 y 2,0 mg/kg al día. Más preferiblemente, estos inmunoconjugados pueden administrarse mediante infusiones intravenosas durante períodos relativamente cortos de 2 a 5 horas, más preferiblemente de 2-3 horas.

Los inmunoconjugados y los programas de dosificación pueden ser eficaces en pacientes resistentes a terapias estándar. Por ejemplo, a un paciente que no ha respondido a una terapia anterior con irinotecán, se le puede administrar un inmunoconjugado de hMN-14-SN-38, el agente precursor de SN-38. Sorprendentemente, el paciente resistente a irinotecán puede mostrar una respuesta parcial a hMN-14-SN-38. La capacidad del inmunoconjugado para dirigirse específicamente al tejido tumoral puede superar la resistencia tumoral mejorando el direccionamiento y potenciando el suministro del agente terapéutico. De manera alternativa, un inmunoconjugado anti-CEACAM5, tal como hMN-14, puede administrarse conjuntamente con un inmunoconjugado anti-CEACAM6, tal como hMN-3 o hMN-15. Otros inmunoconjugados de anticuerpo-SN-38 pueden mostrar eficacia mejorada y/o toxicidad disminuida similar, en comparación con tratamientos terapéuticos estándar alternativos, y combinaciones de diferentes inmunoconjugados de SN-38, o conjugados de SN-38-anticuerpo en combinación con un anticuerpo conjugado con un radionúclido, una toxina u otro fármaco, pueden proporcionar una eficacia incluso más mejorada y/o una toxicidad reducida. Un sujeto preferido específico puede ser un paciente con cáncer de colon metastásico, una paciente con cáncer de mama triple negativo, una paciente con cáncer de mama HER+, ER+, progesterona+, un paciente con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) metastásico, un paciente con cáncer pancreático metastásico, un paciente con carcinoma de células renales metastásico, un paciente con cáncer gástrico metastásico, un paciente con cáncer de próstata metastásico o un paciente con cáncer de pulmón microcítico metastásico.

Algunas realizaciones de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, se refieren a métodos mejorados para preparar conjugados de CL2A-SN38 e inmunoconjugados de anticuerpo-CL2A-SN-38 a gran escala, con un rendimiento y/o una eficiencia mejorados a través del esquema sintético mostrado en la FIG. 1. Preferiblemente, el grupo maleimida al final del enlazador CL2A reacciona con cadenas laterales de sulfhidrilo en restos de cisteína reducidos en una fracción de anticuerpo u otro péptido o proteína diana, aunque se conocen y pueden utilizarse otros métodos para unir la fracción CL2A con la fracción de anticuerpo. En una realización preferida adicional, los inmunoconjugados preparados a partir de la fracción CL2A-SN-38 se purifican mediante filtración de flujo tangencial, evitando así la engorrosa cromatografía en columnas de exclusión por tamaño e interacción hidrofoba, y permitiendo recuperar una gran cantidad de proteínas después de la purificación.

Como se ilustra en la FIG. 1, El producto Fmoc-lisina(MMT)-OH (producto intermedio 1, FIG. 1), con un grupo MMT protector en la cadena lateral de lisina, se hace reaccionar con PABOH y EEDQ en diclorometano para generar Fmoc-Lys(MMT)-PABOH, que se hace reaccionar con dietilamina para formar Lys(MMT)-PABOH (producto intermedio 2, FIG. 1). El producto Lys(MMT)-PABOH se hace reaccionar con PEG-azida en diclorometano con reactivo EEDQ para generar azido-PEG-Lys(MMT)-PABOH (producto intermedio 3, FIG. 1). La fracción de PEG contiene un número definido de monómeros, a diferencia del PEG estándar que contiene una mezcla de diferentes números de monómeros, proporcionando un producto final con una solubilidad y unas características farmacocinéticas más homogéneas. En una reacción distinta, el producto SN-38 se hace reaccionar con TBDMS-Cl para generar 10-O-TBDMS-SN-38 (producto intermedio 4, FIG 1). El producto 10-O-TBDMS-SN-38 se activa mediante una reacción con trifosgeno y DMAP para producir el producto intermedio reactivo 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-cloroformiato (producto intermedio 5, FIG. 1), que reacciona *in situ* con azido-PEG-Lys(MMT)-PABOH para producir el producto intermedio azido-PEG-Lys(MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38-TBDMS (producto intermedio 6, FIG. 1). El producto intermedio 6 se trata con TBAF/AcOH/diclorometano para retirar el grupo protector TBDMS de la fracción SN-38. El azido-PEG-Lys(MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38 (producto intermedio 7, FIG. 1) resultante se hace reaccionar con MCC-Yne (producto intermedio 8, FIG. 1) para producir MCC-PEG-Lys(MMT)-PAB-O-SN-38 (producto intermedio 9, FIG. 1), que contiene un grupo reactivo de maleimida para la conjugación con el anticuerpo. La reacción se produce mediante una reacción de cicloadición mediada por cobre entre la azida en la fracción de PEG y un alquino en el producto intermedio MCC-Yne. Por último, el grupo protector MMT se retira de la cadena lateral de lisina para producir el producto CL2A-SN-38, con una fracción de maleimida reactiva que puede utilizarse para conjugarse anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o cualquier otra proteína o péptido que contenga un grupo sulfhidrilo reducido. El experto familiarizado con la técnica se percatará de que pueden introducirse grupos reactivos distintos de la maleimida si se desea la conjugación con una cadena lateral de aminoácidos distinta de la cisteína.

Según la invención, tal como se define en las reivindicaciones, el conjugado enlazador-SN-38 comprende una fracción escindible intracelularmente que es un carbonato que comprende un grupo hidroxilo activado de la fracción de fármaco y un alcohol 4-aminobencílico o alcohol 4-aminobencílico sustituido, sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> en la posición bencílica, y este último, a través de su grupo amino, está unido a un L-aminoácido o a un polipéptido que comprende hasta cuatro fracciones de L-aminoácido; en donde el extremo N está unido a un reticulante que termina en el grupo de unión a la fracción de anticuerpo.

### Breve descripción de las figuras

**FIG. 1.** Nuevo esquema para mejorar la producción a gran escala de CL2A-SN-38.

**FIG. 2.** Terapia *in vivo* de ratones lampiños atómicos, portadores de carcinoma pancreático humano Capan 1, con conjugados de MAb-CL2A-SN-38.

**FIG. 3.** Terapia *in vivo* de ratones lampiños atómicos, portadores de carcinoma pancreático humano BxPC3, con conjugados de MAb-CL2A-SN-38.

**FIG. 4.** Terapia *in vivo* de ratones lampiños atímicos, portadores de carcinoma de colon humano LS174T, con conjugado de hMN-14-CL2A-SN-38.

**FIG. 5A.** Eficacia terapéutica del ADC hRS7-SN-38, en ratones portadores de xenoinjertos de tumor de pulmón no microcítico humano. A ratones portadores de tumores Calu-3 ( $N = 5-7$ ) se les inyectó hRS7-CL2-SN-38 cada 4 días durante un total de 4 inyecciones (c4dx4). Todos los ADC y los controles se administraron en las cantidades indicadas (expresadas como cantidad de SN-38 por dosis; flechas largas = inyecciones de conjugados, flechas cortas = inyecciones de irinotecán).

**FIG. 5B.** Eficacia terapéutica del ADC hRS7-SN-38 en ratones portadores de xenoinjertos de tumor colorrectal humano. A ratones portadores de tumores COLO 205 ( $N = 5$ ) se les inyectó cada 4 días durante un total de 8 veces (c4dx8) el ADC o cada 2 días durante un total de 5 inyecciones (c2dx5) la MTD (*maximum tolerated dose*, dosis máxima tolerada) de irinotecán. Todos los ADC y los controles se administraron en las cantidades indicadas (expresadas como cantidad de SN-38 por dosis; flechas largas = inyecciones de conjugados, flechas cortas = inyecciones de irinotecán).

**FIG. 5C.** Eficacia terapéutica del ADC hRS7-SN-38 en ratones portadores de xenoinjertos de cáncer pancreático humano. Ratones portadores de tumores ( $N = 10$ ) Capan-1 ( $N = 10$ ) se trataron dos veces a la semana durante 4 semanas con los agentes indicados. Todos los ADC y los controles se administraron en las cantidades indicadas (expresadas como cantidad de SN-38 por dosis; flechas largas = inyecciones de conjugados, flechas cortas = inyecciones de irinotecán).

**FIG. 5D.** Eficacia terapéutica del ADC hRS7-SN-38 en ratones portadores de xenoinjertos de cáncer pancreático humano. Ratones portadores de tumores BxPC-3 ( $N = 10$ ) se trataron dos veces a la semana durante 4 semanas con los agentes indicados. Todos los ADC y los controles se administraron en las cantidades indicadas (expresadas como cantidad de SN-38 por dosis; flechas largas = inyecciones de conjugados, flechas cortas = inyecciones de irinotecán).

**FIG. 5E.** Eficacia terapéutica del ADC hRS7-SN-38 en ratones portadores de xenoinjertos de carcinoma pulmonar humano de células escamosas. Además del ADC administrado dos veces por semana durante 4 semanas, Ratones portadores de tumor SK-MES-1 ( $N = 8$ ) recibieron la MTD de CPT-11 (c2dx5). Todos los ADC y los controles se administraron en las cantidades indicadas (expresadas como cantidad de SN-38 por dosis; flechas largas = inyecciones de conjugados, flechas cortas = inyecciones de irinotecán).

**FIG. 6.** Eficacia comparativa de los conjugados epratuzumab (Emab)-SN-38 y veltuzumab (Vmab)-SN-38 en el modelo de Ramos subcutáneo. A ratones lampiños ( $N = 10$  por grupo) con tumores de un promedio aproximado de  $0,35 \text{ cm}^3$  ( $0,20-0,55 \text{ cm}^3$ ) se les administraron 0,25 o 0,5 mg de cada conjugado dos veces a la semana durante 4 semanas.

**FIG. 7A.** Especificidad del conjugado Emab anti-CD22-SN-38 (línea continua) frente a un conjugado irrelevante de labetuzumab (Lmab)-SN-38 (línea discontinua) en ratones lampiños portadores de tumores Ramos subcutáneos. Durante 4 semanas, los animales recibieron por vía intraperitoneal, dos veces a la semana, dosis de  $75 \mu\text{g}$  de cada conjugado por dosis ( $54,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  de SN-38, basándose en un peso promedio de 22 g). La supervivencia se basó en el tiempo transcurrido hasta la progresión (TTP, siglas del inglés *time-to-progression*) hasta alcanzar los  $3,0 \text{ cm}^3$ , con tumores que empezaban con un tamaño promedio de  $0,4 \text{ cm}^3$ . En cada panel se muestran los valores de  $p$  que comparan la mediana de supervivencia (mostrada) para el conjugado Emab-SN-38 con Lmab-SN-38.

**FIG. 7B.** Especificidad del conjugado Emab anti-CD22-SN-38 (línea continua) frente a un conjugado irrelevante de labetuzumab (Lmab)-SN-38 (línea discontinua) en ratones lampiños portadores de tumores Ramos subcutáneos. Durante 4 semanas, los animales recibieron por vía intraperitoneal, dos veces a la semana, dosis de  $125 \mu\text{g}$  de cada conjugado por dosis ( $91 \mu\text{g}/\text{kg}$  de SN-38, basándose en un peso promedio de 22 g). La supervivencia se basó en el tiempo transcurrido hasta la progresión hasta alcanzar los  $3,0 \text{ cm}^3$ , con tumores que empezaban con un tamaño promedio de  $0,4 \text{ cm}^3$ . En cada panel se muestran los valores de  $p$  que comparan la mediana de supervivencia (mostrada) para el conjugado Emab-SN-38 con Lmab-SN-38.

**FIG. 7C.** Especificidad del conjugado Emab anti-CD22-SN-38 (línea continua) frente a un conjugado irrelevante de labetuzumab (Lmab)-SN-38 (línea discontinua) en ratones lampiños portadores de tumores Ramos subcutáneos. Durante 4 semanas, los animales recibieron por vía intraperitoneal, dos veces a la semana, dosis de  $250 \mu\text{g}$  de cada conjugado por dosis ( $182 \mu\text{g}/\text{kg}$  de SN-38, basándose en un peso promedio de 22 g). La supervivencia se basó en el tiempo transcurrido hasta la progresión hasta alcanzar los  $3,0 \text{ cm}^3$ , con tumores que empezaban con un tamaño promedio de  $0,4 \text{ cm}^3$ . En cada panel se muestran los valores de  $p$  que comparan la mediana de supervivencia (mostrada) para el conjugado Emab-SN-38 con Lmab-SN-38. También se muestran las curvas de supervivencia (línea gris continua) de otro grupo de animales que recibió inyecciones intraperitoneales semanales de irinotecán ( $6,5 \mu\text{g}/\text{dosis}$ ; el equivalente a SN-38 es aproximadamente igual a la dosis de  $250 \mu\text{g}$  del conjugado Emab-SN-38).

**FIG. 8.** Historial del tratamiento anterior del paciente, antes de administrar IMMU-130 (labetuzumab-NS-38). El tratamiento anterior incluía colectomía/hepatectomía de CCR en estadio IV (lóbulo parcial), terapia de ablación por

radiofrecuencia de metástasis hepáticas, resección en cuña de metástasis pulmonares y quimioterapia con irinotecán/oxaliplato, Folfirinox, Folfirinox + bevacizumab, bevacizumab + 5-FU/leucovorina, FolFiri, Folfiri + cetuximab y cetuximab solo. El paciente recibió dosis de 16 mg/kg de IMMU-132 mediante infusión IV lenta cada dos semanas durante un total de 17 dosis de tratamiento.

## 5 Descripción detallada de la invención

### Definiciones

En la siguiente descripción, se utilizan diversos términos y se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de la materia objeto reivindicada. Los términos que no se definen expresamente en la presente memoria se utilizan de acuerdo con su significado simple y habitual.

10 A menos que se especifique otra cosa, un o uno(a) significa "uno(a) o más".

En el presente documento, el término aproximadamente se utiliza para indicar 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 Un anticuerpo, como se emplea en esta memoria, se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, de origen natural o formada por procesos recombinantes de fragmentos de genes de inmunoglobulina normales) (p. ej., un anticuerpo de IgG) o a una porción de una molécula de inmunoglobulina de unión a antígeno, 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, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (y subformas de IgG4), así como isotipos de IgA.

20 Un fragmento de anticuerpo es una parte de un anticuerpo tal como F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv (Fv monocatenario), anticuerpos de dominio único (DAB o VHH) y similares, incluidas las hemimoléculas de IgG4 citadas anteriormente (van der Neut Kofschoten *et al.* (Science 2007; 317(14 de septiembre): 1554-1557). Una forma de anticuerpo de dominio único disponible en el comercio, conocida como nanocuerpo (ABLYNX®, Gante, Bélgica), se analiza con más detalle a continuación. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo de utilidad se une al mismo antígeno que reconoce el anticuerpo intacto. La expresión "fragmento de anticuerpo" también incluye  
25 proteínas sintéticas o diseñadas genéticamente que actúan como un anticuerpo al unirse a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados que consisten en las regiones variables, tales como los fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas monocatenarias recombinantes en las que las regiones variables ligera y pesada, están conectadas por un enlazador peptídico ("proteínas scFv"), y unidades de reconocimiento mínimo que consisten  
30 en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable, tales como las CDR. Los fragmentos Fv se pueden construir de diferentes formas para producir formas de unión multivalentes y/o multiespecíficas. En el caso de las formas multivalentes, estas 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).

35 Un anticuerpo desnudo es generalmente un anticuerpo completo que no está conjugado con un agente terapéutico. Esto es así porque la porción Fc de la molécula de anticuerpo proporciona funciones efectoras o inmunológicas, tales como la fijación del complemento y la ADCC (siglas del inglés *antibody-dependent cell cytotoxicity*, que significa citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), que ponen en marcha mecanismos que pueden dar lugar a la lisis celular. Sin embargo, la porción Fc puede no ser necesaria para la función terapéutica del anticuerpo, sino más bien otros mecanismos, tales como la apoptosis, anti-angiogénesis, actividad anti-metastásica, actividad anti-adhesiva, tal como inhibición de la adhesión heterotípica u homotípica e interferencia en rutas de señalización, pueden entrar en  
40 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 algunos anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos y fragmentos de los mismos. Como se emplea en esta memoria, "desnudo" es sinónimo de "no conjugado", y significa no ligado o conjugado a un agente terapéutico.

45 Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante que contiene los dominios variables de las cadenas de anticuerpos tanto pesadas como ligeras, incluidas las regiones determinantes de complementariedad (CDR, *complementarity determining regions*) de un anticuerpo procedente de una especie, preferiblemente un anticuerpo de roedor, más preferiblemente un anticuerpo murino, mientras que los dominios constantes de la molécula de anticuerpo proceden de los de un anticuerpo humano. Para aplicaciones veterinarias, los dominios constantes del anticuerpo quimérico pueden de los de otras especies, tal como de un primate, un gato o un perro.

50 Un anticuerpo humanizado es una proteína recombinante en la que las CDR de un anticuerpo de una especie; p. ej., un anticuerpo murino, se transfieren de las cadenas variables pesadas y ligeras del anticuerpo murino a los dominios variables pesados y ligeros humanos (regiones estructurales). Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo proceden de los de un anticuerpo humano. En algunos casos, restos específicos de la región estructural del anticuerpo humanizado, particularmente los que están en contacto o cerca de las secuencias de CDR, pueden modificarse, por ejemplo, reemplazarse por los restos correspondientes del anticuerpo murino, roedor, primate subhumano u otro anticuerpo original.

Un anticuerpo humano es un anticuerpo obtenido, por ejemplo, de ratones transgénicos que se han "genomodificado" para producir anticuerpos humanos en respuesta a una exposición antigénica. En esta técnica, elementos de los locus de cadenas pesadas y ligeras humanas se introducen en cepas de ratones procedentes de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones específicas de los locus endógenos de cadenas pesadas y ligeras. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos de varios antígenos, y los ratones pueden utilizarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. En Green *et al.*, Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg *et al.*, Nature 368: 856 (1994) y Taylor *et al.*, Int. Immun. 6:579 (1994), se 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 con tecnología de presentación en fagos, todos ellos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 (1990) para la producción *in vitro* de anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. En esta técnica, genes de dominio variable de anticuerpos se clonan en fase en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presente esas propiedades. De este modo, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos puede realizarse en una variedad de formatos, para su revisión, véase, p. ej., Johnson y Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571 (1993). También pueden generarse anticuerpos humanos a través de linfocitos B activados *in vitro*. Véanse las patentes de Estados Unidos N.º 5 567 610 y 5 229 275.

Enfermedades infecciosas, como se emplea en esta memoria, son enfermedades que implican infección causada por patógenos tales como bacterias, rickettsias, micoplasma, protozoos, hongos, virus, parásitos u otros agentes microbianos. Los ejemplos incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que causa el SIDA, *Mycobacterium* de tuberculosis, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemofilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, virus del Nilo Occidental, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, virus de la rabia, virus de la gripe, citomegalovirus, virus del herpes simple I, virus del herpes simple II, virus parvovírico en suero humano, virus respiratorio sincicial, virus de la varicela zoster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del sarampión, adenovirus, virus de la leucemia humana de células T, virus de Epstein Barr, virus de la leucemia murina, virus de las paperas, virus de la estomatitis vesicular, virus sindbis, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus verrucoso, virus de la lengua azul, virus de Sendai, virus de la leucemia felina, reo virus, virus de la polio, virus de simio 40, virus del tumor mamario del 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*, *Mesocestoides corti*, *Mycoplasma artritidis*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laylawii*, *M. salivarium* y *M. pneumoniae*. En Casadevall, Clin Immunol 1999; 93(1):5-15, se incluye una revisión que enumera anticuerpos contra organismos infecciosos (anticuerpos anti-toxina y antivíricos), así como otras dianas.

Un agente terapéutico es una molécula o un átomo que se administra por separado, simultánea o secuencialmente con una fracción de unión, p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y es útil en el tratamiento de una enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, conjugados, fármacos, agentes citotóxicos, agentes proapoptóticos, toxinas, nucleasas (incluidas ADNasas y ARNasas), hormonas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes, radioisótopos o radionúclidos, oligonucleótidos, ARN de interferencia, péptidos, agentes anti-angiogénicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, quimiocinas, profármacos, enzimas, proteínas o péptidos de unión o combinaciones de los mismos.

Un inmunocnjugado es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo u otra fracción de anticuerpo conjugado con un agente terapéutico. Como se emplea en esta memoria, los términos "conjugado" e "inmunocnjugado" se usan indistintamente.

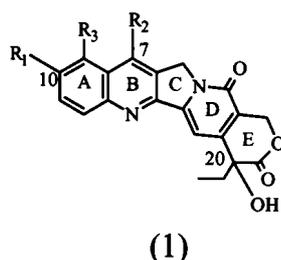
Como se emplea en esta memoria, la expresión proteína de fusión de anticuerpo es una molécula de unión a antígeno producida de forma recombinante en la que uno o más anticuerpos naturales, anticuerpos monocatenarios o fragmentos de anticuerpo, están unidos a otra fracción, tal como una proteína o un péptido, una toxina, una citocina, una hormona, etc. En algunas realizaciones preferidas, la proteína de fusión puede comprender dos o más anticuerpos iguales o diferentes, fragmentos de anticuerpo o anticuerpos monocatenarios fusionados entre sí, que pueden unirse al mismo epítipo, a diferentes epítipos en el mismo antígeno, o a diferentes antígenos.

Un inmunomodulador es un agente terapéutico que, cuando está presente, altera, suprime o estimula el sistema inmunológico del cuerpo. Normalmente, un inmunomodulador de utilidad estimula a las células inmunitarias para que proliferen o se activen en una cascada de respuesta inmunitaria, tales como macrófagos, células dendríticas, células B y/o células T. Sin embargo, en algunos casos, un inmunomodulador puede suprimir la proliferación o activación de las células inmunitarias, como en el tratamiento terapéutico de enfermedades autoinmunitarias. Un ejemplo de un inmunomodulador como se describe en la presente memoria, es una citocina, que es una pequeña proteína soluble

de aproximadamente 5-20 kDa que es liberada por una población de células (p. ej., linfocitos T sensibilizados) en contacto con antígenos específicos, y que actúa como mediador intercelular entre células. Como comprenderá el experto en la técnica, los ejemplos de citocinas incluyen linfocinas, monocinas, interleucinas y diversas moléculas de señalización relacionadas, tales como factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*) e interferones. Las quimiocinas son un subconjunto de citocinas. Algunas interleucinas e interferones son ejemplos de citocinas que estimulan la proliferación de linfocitos T u otras células inmunitarias.

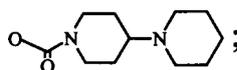
CPT es una abreviatura de camptotecina. Como se emplea en la presente solicitud, CPT representa la propia camptotecina o un análogo o derivado de la camptotecina. Las estructuras de la camptotecina y de algunos de sus análogos, con la numeración indicada y los anillos identificados con las letras A-E,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

Esquema 1



CPT:  $R_1 = R_2 = R_3 = H$

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



$R_2 =$  etilo;  $R_3 = H$  SN-38:  $R_1 = OH$ ;  $R_2 =$  etilo;  $R_5 = H$

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

Abreviaturas químicas:

DCA - Ácido dicloroacético

Fmoc - Cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo

EEDQ - 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina

MCC-yne - 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida

MMT: Monometoxitritilo

PABOH alcohol-*p*-aminobenzílico

PEG - Polietilenglicol

TBAF - Fluoruro de tetra-*n*-butilamonio

TBDMS - terc-butildimetilsililo

**Conjugados de camptotecina**

A continuación se describen métodos y composiciones no limitantes para preparar inmunocombinados que comprenden un agente terapéutico de camptotecina unido a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno. Según la invención, tal como se define en las reivindicaciones, la solubilidad del fármaco se potencia colocando una fracción de polietilenglicol (PEG) definida (es decir, un PEG que contiene un número definido de unidades monoméricas) entre el fármaco y el anticuerpo, en donde el PEG definido es un PEG de bajo peso molecular, que contiene preferiblemente 1-30 unidades monoméricas, que contiene más preferiblemente 1-12 unidades monoméricas.

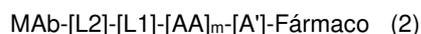
Preferiblemente, un primer enlazador conecta el fármaco en un extremo y puede terminar con un grupo acetileno o azida en el otro extremo. Este primer enlazador puede comprender una fracción de PEG definida con un grupo azida o acetileno en un extremo y un grupo reactivo diferente, tal como ácido carboxílico o grupo hidroxilo, en el otro extremo. Dicho PEG definido bifuncional puede unirse al grupo amina de un aminoalcohol, y el grupo hidroxilo de este último

puede unirse al grupo hidroxilo del fármaco en forma de carbonato. De manera alternativa, la fracción no azida (o acetileno) de dicho PEG bifuncional definido, puede estar unida al extremo N de un L-aminoácido o un polipéptido, estando el extremo C unido al grupo amino del aminoalcohol, y pudiendo estar el grupo hidroxilo de este último, unido al grupo hidroxilo del fármaco en forma de carbonato o carbamato, respectivamente.

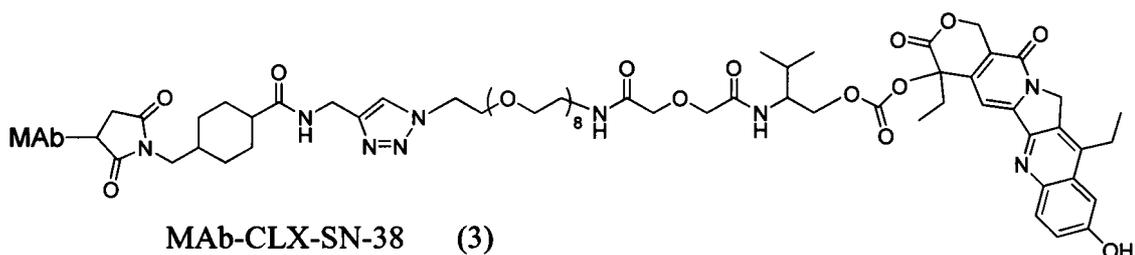
- 5 Un segundo enlazador, que comprende un grupo de acoplamiento de anticuerpos y un grupo reactivo complementario al grupo azida (o acetileno) del primer enlazador, concretamente, acetileno (o azida), puede reaccionar con el primer enlazador del fármaco, conjugado mediante la reacción de cicloadición de acetileno-azida para proporcionar un producto farmacológico bifuncional final que sea útil para conjugarse con anticuerpos dirigidos a enfermedades. El grupo de acoplamiento del anticuerpo es preferiblemente un tiol o un grupo reactivo con tiol.
- 10 A continuación, se proporcionan métodos para la regeneración selectiva del grupo 10-hidroxilo en presencia del carbonato C-20 en las preparaciones de precursores de enlazador-fármaco que implican análogos de CPT tales como SN-38. Otros grupos protectores de grupos hidroxilo reactivos en fármacos tales como el hidroxilo fenólico en SN-38, por ejemplo, t-butildimetilsililo o t-butildifenilsililo, también pueden utilizarse, y estos pueden desprotegerse con fluoruro de tetrabutilamonio antes de la unión del fármaco derivatizado a una fracción de acoplamiento de anticuerpo. como alternativa, el grupo 10-hidroxilo de los análogos de CPT está protegido como un éster o carbonato, que no sea 'BOC', de manera que la CPT bifuncional se conjuga con un anticuerpo sin desprotección anterior de este grupo protector. El grupo protector se puede desproteger fácilmente en condiciones de pH fisiológico después de la administración del bioconjugado.

- 20 En el acoplamiento de acetileno-azida, denominado "química clic", la parte azida puede estar en L2 con la parte acetileno en L3. De manera alternativa, L2 puede contener acetileno, conteniendo L3 azida. La 'química clic' se refiere a una reacción de cicloadición catalizada por cobre (+1) entre una fracción de acetileno y una fracción de azida (Kolb HC y Sharpless KB, Drug Discov Today 2003; 8: 1128-37), aunque se conocen y pueden utilizarse formas alternativas de química clic. La reacción utiliza una mezcla de bromuro cuproso y trifenilfosfina para permitir un acoplamiento sumamente eficaz en disolventes orgánicos no polares, tal como diclorometano. La ventaja de la química clic es que es quimioselectiva y complementa otras químicas de conjugación bien conocidas, tales como la reacción de tiol-maleimida. En el siguiente análisis, en donde un conjugado comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, otro tipo de fracción de unión, tal como un péptido de direccionamiento, puede sustituirse.
- 25

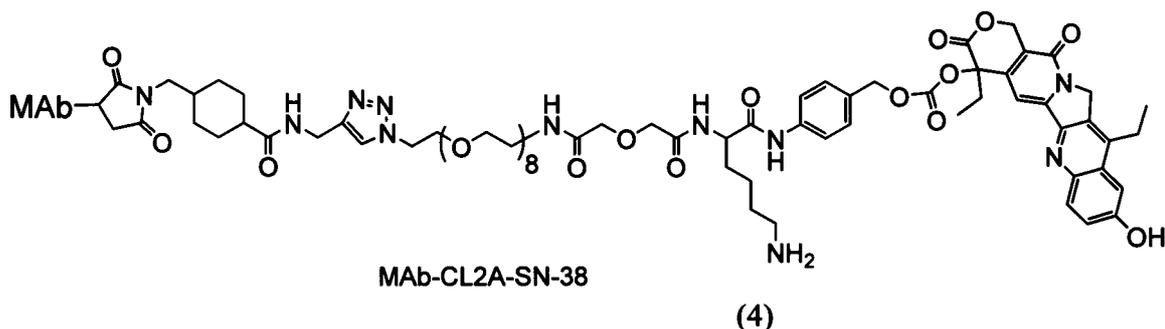
Una enseñanza genérica se dirige a un conjugado de un derivado farmacológico y un anticuerpo de fórmula general 2,



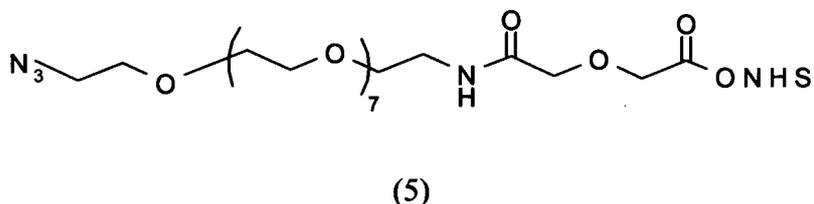
- 30 en donde MAb es un anticuerpo de direccionamiento a enfermedad; L2 es un componente del reticulante que comprende una fracción de acoplamiento de anticuerpo y uno o más de grupos acetileno (o azida); L1 comprende un PEG definido con azida (o acetileno) en un extremo, complementario a la fracción de 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 L aminoácidos de 'AA' se seleccionan de 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 grupo amino del fármaco en forma de carbonato o carbamato, respectivamente.
- 35
- 40 En la fórmula 2, la 'A' de la fórmula general 2 es preferiblemente A-OH, por lo cual la fracción A-OH es una fracción plegable, tal como alcohol 4-aminobencílico o un alcohol 4-aminobencílico sustituido, que está sustituido por un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> en la posición bencílica, y este último, a través de su grupo amino, está unido a un L-aminoácido o a un polipéptido que comprende hasta cuatro fracciones de L-aminoácido; en donde el extremo N está unido a un reticulante que termina en el grupo de unión a la fracción de anticuerpo.
- 45 A continuación se da un ejemplo, en donde la representación A-OH de A' de fórmula general (2) procede de alcohol 4-aminobencílico sustituido, y 'AA' está compuesto por un solo L-aminoácido siendo m=1 en la fórmula general (2), y el fármaco se ejemplifica con SN-38. La estructura se representa a continuación (fórmula 3, denominada MAb-CLX-SN-38). Un solo aminoácido de AA se selecciona de uno cualquiera de los siguientes L-aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. El sustituyente R en la fracción de alcohol 4-aminobencílico (realización A-OH de A') es hidrógeno o un grupo alquilo seleccionado de grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>.
- 50



Una realización de MAb-CLX-SN-38 de fórmula 3, en donde el aminoácido AA es L-lisina y R = H, y el fármaco se ejemplifica mediante SN-38 (fórmula 4; denominado MAb-CL2A-SN-38).



- 5 En otro ejemplo, el componente L1 del conjugado contiene un espaciador de polietilenglicol (PEG) definido con 1-30 unidades monoméricas repetidas. En una realización preferida adicional, 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 en el comercio. El PEG heterobifuncional puede contener un grupo azida o acetileno. A continuación en la fórmula 5, se da un ejemplo de un PEG heterobifuncional definido que contiene
- 10 8 unidades monoméricas repetidas, siendo 'NHS' succinimidilo:



- Según la invención, tal como se define en las reivindicaciones, el proceso de producción de CL2A-SN-38 es como se muestra en la FIG. 1. En este proceso, en la preparación de CL2A-SN-38, que se utiliza para producir el
- 15 inuncojugado MAb-CL2A-SN-38, se han realizado algunos cambios de proceso significativos. Estos cambios en los procedimientos descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 7 999 083, no obvios para un experto en la técnica habitual, comprenden los siguientes cambios.

1) Aunque anteriormente se usó hexano para precipitar Lys(MMT)-PABOH (producto intermedio 2 en la FIG. 1), el heptano se sustituyó por hexano como una alternativa más segura. La dietilamina residual no retirada se analizó mediante espectroscopía de RMN. Si se detectó la presencia de dietilamina, el material se purificó adicionalmente para retirar la dietilamina, lo que impidió la reducción del rendimiento debido a la presencia de dietilamina en el

20 producto intermedio 2.

2) En la preparación de 10-O-TBDMS-SN-38 (producto intermedio 4 en la FIG. 1) de SN-38, la dimetilformamida (DMF) que se usó previamente como disolvente para la reacción, se reemplazó por diclorometano (DCM), facilitando así la retirada del disolvente después de la reacción. El cambio de DMF a DCM se realizó para facilitar el aumento de escala así como para reducir el rendimiento de producto que se observó ocasionalmente con la

25 reacción en DMF. La protección del grupo hidroxilo con cloruro de terc-butildimetilsililo se realiza habitualmente utilizando DMF como disolvente, aunque se han utilizado otros disolventes (Greene TW y Wuts PGM, Protecting Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Inc., 1999; págs. 127-132). En el contexto de SN-38, se prefirió el uso de DMF ya que el material es solo poco soluble en DCM. *El alto rendimiento de la formación de producto en medio DCM fue inesperado y no podía haberse previsto.*

30

3) En la conversión de 10-O-TBDMS-SN-38 a su producto intermedio reactivo 5 cloroformiato en la FIG. 1, a la solución de diclorometano se la añadió trifosgeno en porciones en lugar de un lote. Este rendimiento conservado, impide al mismo tiempo un aumento posiblemente peligroso de las temperaturas de reacción en la fabricación a gran escala.

4) En la reacción de cicloadición entre azido-PEG-Lys(MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38 (producto intermedio 7 en la FIG. 1) y MCC-Yne (producto intermedio 8 en la FIG. 1) para dar como resultado el penúltimo producto intermedio, MCC-PEG-Lys(MMT)-PABOCO-20-O-SN-38 (producto intermedio 9 en la FIG. 1), se descubrió que el producto era inestable si la mezcla de reacción se preparaba primero mediante extracción con EDTA para eliminar la sal de cobre, conduciendo a la reducción del rendimiento. Sorprendentemente, también se descubrió que si la cromatografía de la mezcla de reacción se realizaba primero, seguido de extracción con EDTA para retirar la sal de cobre residual que no estaba completamente atrapada en la columna de gel de sílice, el producto era estable. Este cambio de proceso también condujo a mejoras en el rendimiento al impedir la formación de productos secundarios no deseados. La mejora de la estabilidad del producto intermedio 9 antes de la purificación mediante la simple inversión de la secuencia de operaciones, concretamente realizando primero la cromatografía seguido de la extracción con EDTA, no estaba prevista.

5) En la misma reacción que se describe en el punto 4 anterior, cuando el tiempo de reacción se redujo a 14 horas en lugar de a 18-24 horas, se obtuvo un rendimiento mejorado.

En algunas realizaciones de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, cuando el fármaco bifuncional contiene una fracción reactiva con tiol como grupo de unión al anticuerpo, los tioles del anticuerpo que se va a marcar pueden generarse en las cadenas laterales de los grupos de lisina del anticuerpo, en lugar de en los restos de cisteína reducidos, utilizando un reactivo tiolante. En el campo técnico se conocen bien métodos para introducir grupos tiol en los anticuerpos mediante modificaciones de grupos de lisina de los MAb (Wong en *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, CRC Press, Inc., Boca Ratón, FL (1991), págs. 20-22). De manera alternativa, la reducción leve de los enlaces disulfuro intercatenarios en el anticuerpo utilizando el agente reductor, tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP), puede generar de 7 a 10 tioles en el anticuerpo; que tiene la ventaja de incorporar múltiples fracciones de fármaco en la región intercatenaria del MAb lejos de la región de unión al antígeno. Por otra parte, después de la reducción con TCEP, no es necesario realizar una purificación previa del anticuerpo reducido, y el anticuerpo reducido con disulfuro se conjuga *in situ* con el CL2A-SN-38 reactivo con tiol.

En otra realización preferida de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, los conjugados de anticuerpos y CL2A-SN-38 se purifican mediante el método de filtración de flujo tangencial (FFT) utilizando una membrana de corte de peso molecular de 50 000 Da con 25 a 30 volúmenes de diafiltración del tampón de formulación del conjugado para purificar cientos de gramos de los conjugados. Con este método no es necesario emplear purificaciones cromatográficas costosas y engorrosas en columnas de cromatografía de exclusión por tamaño e hidrófobas.

En otra realización más de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, los conjugados se formulan en tampones biológicos de Good a un pH de 6 a 7,0 y se liofilizan para su conservación. Preferiblemente, el tampón de Good se selecciona del grupo que consiste en ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico (HEPES) y ácido 1,4-piperazindietanosulfónico (PIPES), en el intervalo de pH de 6-7, preferiblemente en el intervalo de pH de 6,5 a 7, y a una concentración de tampón de 10-100 mM, preferiblemente 25 mM. El tampón de formulación más preferido es MES 25 mM, pH 6,5.

En una realización adicional de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, los conjugados purificados se combinan con excipientes tales como trehalosa y polisorbato 80, se liofilizan y se conservan como liofilizados en el intervalo de temperatura de -20° C a 8° C.

#### Técnicas generales de anticuerpos

En el campo técnico se conocen bien técnicas para preparar anticuerpos monoclonales contra prácticamente cualquier antígeno diana. 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). En resumen, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener inyectando a ratones con una composición que comprenda un antígeno, extrayendo el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que produzcan anticuerpos contra el antígeno, cultivando los clones que produzcan anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridomas.

Varias técnicas, tales como la producción de anticuerpos quiméricos o humanizados, pueden implicar procedimientos de clonación y construcción de anticuerpos. Las secuencias de  $V_K$  (cadena ligera variable) y  $V_H$  (cadena pesada variable) de un anticuerpo de interés, pueden obtenerse mediante una variedad de procedimientos de clonación molecular, tales como RT-PCR, 5'-RACE y exploración de bibliotecas de ADNc. Los genes V de un anticuerpo de una célula que expresa un anticuerpo murino pueden clonarse mediante amplificación por PCR y secuenciarse. Para confirmar su autenticidad, los genes  $V_L$  y  $V_H$  pueden expresarse en cultivo celular como un Ab quimérico tal como describen Orlandi. *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci., Estados Unidos*, 86: 3833 (1989)). Después, basándose en las secuencias del gen V, se puede diseñar y construir un anticuerpo humanizado tal como describen Leung *et al.* (*Mol. Immunol.*, 32: 1413 (1995)).

El ADNc se puede preparar a partir de cualquier línea de hibridoma o línea celular transfectada conocida que produzca un anticuerpo murino mediante técnicas generales de clonación molecular (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*, A

laboratory manual, 2<sup>a</sup> Ed. (1989)). La secuencia de V<sub>K</sub> del anticuerpo puede amplificarse utilizando los cebadores VK1BACK y VK1FOR (Orlandi *et al.*, 1989) o el conjunto de cebadores ampliado descrito por Leung *et al.* (BioTechniques, 15: 286 (1993)). Las secuencias de V<sub>H</sub> se pueden amplificar utilizando el par de cebadores VH1BACK/VH1FOR (Orlandi *et al.*, 1989) o los cebadores que se hibridan con la región constante de la IgG murina descrita por Leung *et al.* (Hybridoma, 13:469 (1994)). Los genes de V humanizados se pueden construir mediante una combinación de síntesis de moldes de oligonucleótidos largos y amplificación por PCR tal como describen Leung *et al.* (Mol. Immunol., 32: 1413 (1995)).

Los productos de la PCR para V<sub>K</sub> se pueden subclonar en un vector de estadificación, tal como un vector de estadificación basado en pBR327, VKpBR, que contiene un promotor de Ig, una secuencia de péptido señal y sitios de restricción convenientes. Los productos de la PCR para V<sub>H</sub> se pueden subclonar en un vector de estadificación similar, tal como el vector VHpBS basado en pBluescript. Los casetes de expresión que contienen las secuencias de V<sub>K</sub> y V<sub>H</sub> junto con el promotor y las secuencias de péptido señal, pueden escindirse de VKpBR y VHpBS y ligarse en vectores de expresión apropiados, tales como pKh y pG1g, respectivamente (Leung *et al.*, Hybridoma, 13:469 (1994)). Los vectores de expresión se pueden cotransfectar en una célula apropiada y los fluidos sobrenadantes se pueden monitorizar para la producción de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. De manera alternativa, los casetes de expresión de V<sub>K</sub> y V<sub>H</sub> se pueden escindir y subclonar en un solo vector de expresión, tal como pdHL2, como describen Gillies *et al.* (J. Immunol. Methods 125: 191 (1989) y también como se muestra en Losman *et al.*, Cancer, 80:2660 (1997)).

De manera alternativa, los vectores de expresión se pueden transfectar en células hospedadoras que se han adaptado previamente para la transfección, el crecimiento y la expresión en medio asérico. Las líneas celulares ejemplares que pueden utilizarse incluyen las líneas celulares Sp/EEE, Sp/ESF y Sp/ESF-X (véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos N<sup>o</sup> 7 531 327; 7 537 930 y 7 608 425). Estas líneas celulares ejemplares están basadas en la línea celular de mieloma Sp2/0, transfectadas con un gen Bcl-EEE mutante, expuestas a metotrexato para amplificar secuencias génicas transfectadas y preadaptadas a una línea celular asérica para la expresión de proteínas.

#### Anticuerpos quiméricos y humanizados

Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante en la que las regiones variables de un anticuerpo humano se han reemplazado por las regiones variables de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, incluyendo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo de ratón. Los anticuerpos quiméricos muestran mayor inmunogenicidad y menor estabilidad cuando se administran a un sujeto. En el campo técnico se conocen bien métodos para construir anticuerpos quiméricos (p. ej., Leung *et al.*, 1994, Hybridoma 13:469).

Un anticuerpo monoclonal quimérico se puede humanizar transfiriendo las CDR de ratón de las cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a los correspondientes dominios variables de un anticuerpo humano. En el anticuerpo monoclonal quimérico, las regiones estructurales (FR, *framework regions*) de ratón también se reemplazan por secuencias de FR humanas. Para preservar la estabilidad y la especificidad antigénica del anticuerpo monoclonal humanizado, uno o más restos de FR humanos pueden reemplazarse por restos homólogos de ratón. Para el tratamiento terapéutico de sujetos pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanizados. En el campo técnico se conocen bien técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales humanizados. (Véase, p. ej., Jones *et al.*, 1986, Nature, 321:522; Riechmann *et al.*, Nature, 1988, 332:323; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science, 239:1534; Carter *et al.*, 1992, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:4285; Sandhu, Crit. Rev. Biotech., 1992, 12:437; Tempest *et al.*, 1991, Biotechnology 9:266; Singer *et al.*, J. Immun., 1993, 150:2844.)

Otras realizaciones de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, pueden referirse a anticuerpos de primates no humanos. Técnicas generales para generar anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos, pueden encontrarse, por ejemplo, en Goldenberg *et al.*, documento WO 91/11465 (1991) y en Losman *et al.*, Int. J. Cancer 46: 310 (1990). En otra realización, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos pueden obtenerse a partir de ratones transgénicos que se han genomodificado para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición antigénica, como se explica a continuación.

#### Anticuerpos humanizados

En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos completamente humanos utilizando enfoques combinatorios o animales transgénicos transformados con locus de inmunoglobulina humana (p. ej., 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 muestren aún menos efectos secundarios que los anticuerpos quiméricos o humanizados y actúen *in vivo* como anticuerpos humanos esencialmente endógenos. En algunas realizaciones, los métodos y procedimientos reivindicados pueden utilizar anticuerpos humanos producidos mediante dichas técnicas.

En una alternativa, la técnica de presentación en fagos puede utilizarse para generar anticuerpos humanos (p. ej., 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 muestren una patología particular, tal como cáncer (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). La ventaja de construir anticuerpos humanos a partir de un individuo enfermo es que el repertorio

de anticuerpos circulantes puede estar sesgado hacia anticuerpos contra antígenos asociados a enfermedades.

En un ejemplo no limitativo de esta metodología, Dantas-Barbosa *et al.* (2005) construyeron una biblioteca de presentación en fagos de fragmentos de anticuerpos Fab humanos de pacientes con osteosarcoma. En general, se obtuvo ARN total de linfocitos sanguíneos circulantes (*Id.*). Los Fab recombinantes se clonaron a partir de los repertorios de anticuerpos de cadena  $\mu$ ,  $\gamma$  y  $\kappa$  y se insertaron en una biblioteca de presentación en fagos (*Id.*) Los ARN se convirtieron en ADNc y se utilizaron para producir bibliotecas de ADNc de Fab utilizando cebadores específicos contra las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera (Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97). La construcción de la biblioteca se realizó según Andris-Widhopf *et al.* (2000, en: *Phage Display Laboratory Manual*, Barbás *et al.* (eds), 1ª 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 producir la biblioteca de presentación en fagos. Dichas bibliotecas se pueden explorar mediante métodos estándar de presentación en fagos. El experto en la técnica se percatará de que esta técnica es sólo un ejemplo y que se puede utilizar cualquier método conocido para fabricar y explorar anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo mediante presentación en fagos.

En otra alternativa, los animales transgénicos que se han modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos, pueden utilizarse para generar anticuerpos esencialmente contra cualquier diana inmunogénica, utilizando protocolos de inmunización estándar tal como se indicó anteriormente. En Green *et al.*, *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856 (1994) y Taylor *et al.*, *Int. Immun.* 6:579 (1994), se describen métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos. Un ejemplo no limitativo de dicho sistema es el XenoMouse® (p. ej., Green *et al.*, 1999, *J. Immunol. Methods* 231: 11-23) de Abgenix (Fremont, CA). En el XenoMouse® y animales similares, los genes de anticuerpos de ratón se han inactivado y reemplazado por genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que el resto del sistema inmunitario del ratón permanece intacto.

El XenoMouse® se transformó con YAC (siglas del inglés, *yeast artificial chromosomes*, cromosomas artificiales de levadura) configurados en la línea germinal que contenían partes de los locus de IgH e Ig kappa humanos, incluyendo la mayoría de las secuencias de regiones variables, junto con genes accesorios y secuencias reguladoras. El repertorio de la región variable humana puede utilizarse para generar células B productoras de anticuerpos, que pueden procesarse en hibridomas mediante técnicas conocidas. Un XenoMouse® inmunizado con un antígeno diana producirá anticuerpos humanos a través de la respuesta inmunitaria normal, que se pueden recoger y/o producir mediante técnicas estándar comentadas anteriormente. Se dispone de diversas cepas de XenoMouse®, pudiendo cada una de ellas producir una clase diferente de anticuerpo. Se ha demostrado que los anticuerpos humanos producidos transgénicamente tienen potencial terapéutico, conservando al mismo tiempo las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos humanos normales (Green *et al.*, 1999). El experto en la técnica se percatará de que las composiciones y los métodos reivindicados no se limitan al uso del sistema XenoMouse®, sino que se puede utilizar cualquier animal transgénico que se haya modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos.

### 35 *Producción de fragmentos de anticuerpo*

Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento se puede escindir adicionalmente utilizando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. De manera alternativa, una escisión enzimática utilizando pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc. Se describen métodos ejemplares para producir fragmentos de anticuerpo en la patente de Estados Unidos N° 4 036 945; patente de Estados Unidos N° 4 331 647; Nisonoff *et al.*, 1960, *Arch Biochem Biophys*, 89:230; Porter, 1959, *Biochem. J.*, 73:119; Edelman *et al.*, 1967, *METHODS IN ENZYMOLOGY*, página 422 (Academic Press) y en Coligan *et al.* (eds.), 1991, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, (John Wiley & Sons).

También pueden utilizarse 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, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que reconoce el anticuerpo intacto. Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar *et al.*, 1972, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 69:2659. De manera alternativa, las cadenas variables pueden ligarse a través de un enlace disulfuro intermolecular o reticularse con productos químicos tal como glutaraldehído. Véase Sandhu, 1992, *Crit. Rev. Biotech.*, 12:437.

Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas monocatenarias de unión a antígeno (scFv) se preparan mediante la construcción de un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, conectados a través de una secuencia enlazadora de oligonucleótidos. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que posteriormente se introduce en una célula hospedadora, tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una sola cadena polipeptídica con un péptido enlazador que establece un puente con los dos dominios V. En el campo técnico se conocen bien métodos para producir los scFv. Véase Whitlow *et al.*, 1991, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97; Bird *et al.*, 1988, *Science*, 242:423; la patente de Estados Unidos N° 4 946 778; Pack *et al.*, 1993,

Bio/Technology, 11:1271 y Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de un solo dominio (dAb), a veces denominado anticuerpo monocatenario. En el campo técnico se conocen bien técnicas para producir anticuerpos de un solo dominio (véase, p. ej., Cossins *et al.*, Protein Expression and Purification, 2007, 51:253-59; Shuntao *et al.*, Molec Immunol 06, 43:1912-19; Tanha *et al.*, J. Biol. Chem. 2001, 276:24774-780). Otros tipos de fragmentos de anticuerpos pueden comprender una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los péptidos ("unidades mínimas de reconocimiento") de CDR pueden obtenerse construyendo genes que codifiquen la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, utilizando 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); Abedul *et al.*, eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, páginas 137-185 (Wiley-Liss, Inc.)

*Variaciones de anticuerpos*

En algunas realizaciones de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, las secuencias de anticuerpos, tales como las porciones Fc de los anticuerpos, pueden variarse para optimizar las características fisiológicas de los conjugados, tales como la semivida en suero. En el campo técnico se conocen bien métodos de sustitución de secuencias de aminoácidos en proteínas, tales como mediante mutagénesis dirigida (p. ej., Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A laboratory manual, 2ª Ed., 1989). En realizaciones preferidas, la variación puede implicar la adición o retirada de uno o más sitios de glucosilación en la secuencia Fc (p. ej., patente de Estados Unidos Nº 6 254 868). En otras realizaciones preferidas, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos específicas en la secuencia Fc (p. ej., Hornick *et al.*, 2000, J Nucl Med 41:355-62; Hinton *et al.*, 2006, J Immunol 176: 346-56; Petkova *et al.* 2006, Int Immunol 18: 1759-69; patente de Estados Unidos Nº 7 217 797).

**Alotipos de anticuerpos**

La inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos se asocia a un mayor riesgo de reacciones de infusión y a una menor duración de la respuesta terapéutica (Baert *et al.*, 2003, N Engl J Med 348: 602-08). El grado al cual los anticuerpos terapéuticos inducen una respuesta inmunitaria en el hospedador puede estar determinado en parte por el alotipo del anticuerpo (Stickler *et al.*, 2011, Genes and Immunity 12: 213-21). El alotipo del anticuerpo está relacionado con variaciones de la secuencia de aminoácidos en ubicaciones específicas en las secuencias de la región constante del anticuerpo. Los alotipos de los anticuerpos de IgG que contienen una región constante de cadena pesada de tipo  $\gamma$ , se denominan alotipos Gm (1976, J Immunol 117: 1056-59).

Para los anticuerpos humanos de IgG1 comunes, el alotipo más frecuente es G1m1 (Stickler *et al.*, 2011, Genes and Immunity 12: 213-21). Sin embargo, el alotipo G1m3 también aparece con frecuencia en personas de raza caucásica (Stickler *et al.*, 2011). Se ha informado que los anticuerpos G1m1 contienen secuencias alotípicas que tienden a inducir una respuesta inmunitaria cuando se administran a receptores que no son G1m1 (nG1m1), tales como pacientes G1m3 (Stickler *et al.*, 2011). Los anticuerpos del alotipo no G1m1 no son tan inmunogénicos cuando se administran a pacientes G1m1 (Stickler *et al.*, 2011).

El alotipo G1m1 humano comprende los aminoácidos ácido aspártico en la posición 356 de Kabat y leucina en la posición 358 de Kabat, en la secuencia CH3 de la IgG1 de cadena pesada. El alotipo nG1m1 comprende los aminoácidos ácido glutámico en la posición 356 de Kabat y metionina en la posición 358 de Kabat. Ambos alotipos, G1m1 y nG1m1, comprenden un resto de ácido glutámico en la posición 357 de Kabat y algunas veces los alotipos se denominan alotipos DEL y EEM. A continuación se muestra un ejemplo no limitante de las secuencias de la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos de los alotipos G1m1 y nG1m1 para los anticuerpos ejemplares rituximab (SEQ ID NO: 85) y veltuzumab (SEQ ID NO: 86).

***Secuencia de la región variable de la cadena pesada de rituximab (SEQ ID NO: 85)***

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTEP  
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNH  
 YTKQKSLSLSPGK

**Secuencia de la región variable de la cadena pesada de Veltuzumab (SEQ ID NO: 86)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH  
 YTQKSLSLSPGK

5 Jefferis y Lefranc (2009, mAbs 1:1-7) revisaron las variaciones de secuencia características de los alotipos de IgG y su efecto sobre la inmunogenicidad. Informaron que el alotipo G1m3 se caracteriza por un resto de arginina en la posición 214 de Kabat, en comparación con un resto de lisina en la posición 214 de Kabat en el alotipo G1m17. El alotipo nG1m1,2 se caracteriza por ácido glutámico en la posición 356 de Kabat, metionina en la posición 358 de Kabat y alanina en la posición 431 de Kabat. El alotipo G1m1,2 se caracteriza por ácido aspártico en la posición 356 de Kabat, leucina en la posición 358 de Kabat y glicina en la posición 431 de Kabat. Además de las variantes de secuencia de la región constante de la cadena pesada, Jefferis y Lefranc (2009) comunicaron variantes alotípicas en la región constante de la cadena ligera kappa, con el alotipo Km1 caracterizado por valina en la posición 153 de Kabat y leucina en la posición 191 de Kabat, el alotipo Km1,2 caracterizado por alanina en la posición 153 de Kabat y leucina en la posición 191 de Kabat, y el alotipo Km3 caracterizado por alanina en la posición 153 de Kabat y valina en la posición 191 de Kabat.

15 Con respecto a los anticuerpos terapéuticos, veltuzumab y rituximab son, respectivamente, anticuerpos de IgG1 humanizados y quiméricos contra CD20, de uso para la terapia de una amplia variedad de neoplasias malignas hematológicas y/o enfermedades autoinmunitarias. La **Tabla 1** compara las secuencias alotípicas de rituximab frente a veltuzumab. Como se muestra en la **Tabla 1**, rituximab (G1m17,1) es una IgG1 de alotipo DEL, con una variación de secuencia adicional en la posición 214 de Kabat (CH1 de cadena pesada) de lisina en rituximab frente a arginina en veltuzumab. Se ha informado que veltuzumab es menos inmunogénico en sujetos que rituximab (véase, p. ej., Morchhauser *et al.*, 2009, J Clin Oncol 27: 3346-53; Goldenberg *et al.*, 2009, Blood 113: 1062-70; Robak y Robak, 2011, BioDrugs 25: 13-25), un efecto que se ha atribuido a la diferencia entre anticuerpos humanizados y quiméricos. Sin embargo, la diferencia en alotipos entre los alotipos EEM y DEL probablemente también explica la menor inmunogenicidad de veltuzumab.

**Tabla 1. Alotipos de rituximab frente a Veltuzumab**

	Alotipo completo	Posición de la cadena pesada y alotipos asociados					
		214 (alotipo)		356/358 (alotipo)		431 (alotipo)	
Rituximab	G1m17,1	K	17	D/L	1	A	-
Veltuzumab	G1m3	R	3	E/M	-	A	-

25 Para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos en individuos del genotipo nG1m1, es deseable seleccionar el alotipo del anticuerpo para que corresponda al alotipo G1m3, caracterizado por arginina en la posición 214 de Kabat, y el alotipo nulo nG1m1,2, caracterizado por ácido glutámico en la posición 356 de Kabat, metionina en la posición 358 de Kabat y alanina en la posición 431 de Kabat. Sorprendentemente, se descubrió que la administración subcutánea repetida de anticuerpos G1m3 durante un largo período de tiempo no daba como resultado una respuesta inmunitaria significativa. En realizaciones alternativas, la cadena pesada de la IgG4 humana en común con el alotipo G1m3 tiene arginina en la posición 214 de Kabat, ácido glutámico en la posición 356 de Kabat, metionina en la posición 359 de Kabat y alanina en la posición 431 de Kabat. Dado que la inmunogenicidad parece relacionarse al menos en parte con los restos en esos lugares, el uso de la secuencia de la región constante de la cadena pesada de la IgG4 humana para anticuerpos terapéuticos también es una realización preferida. Las combinaciones de anticuerpos IgG1 G1m3 con anticuerpos IgG4 también pueden ser útiles para la administración terapéutica.

**Anticuerpos conocidos**

40 En varias realizaciones de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, los métodos reivindicados pueden utilizar cualquiera de una variedad de anticuerpos conocidos en la técnica. Los anticuerpos de utilidad pueden obtenerse en el comercio de diversas fuentes conocidas. Por ejemplo, una variedad de líneas de hibridomas secretoras de anticuerpos están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Una gran

cantidad de anticuerpos contra diversas dianas de enfermedad, incluidos, entre otros, antígenos asociados a tumores, se han depositado en la ATCC y/o se han publicado secuencias de regiones variables y están disponibles para su uso en los métodos y composiciones que se reivindican. Véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos N° 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; 5 7.038.018; 7.037.498; 7.012.133; 7.001.598; 6.998.468; 6.994.976; 6.994.852; 6.989.241; 6.974.863; 6.965.018; 6.964.854; 6.962.981; 6.962.813; 6.956.107; 6.951.924; 6.949.244; 6.946.129; 6.943.020; 6.939.547; 6.921.645; 6.921.645; 6.921.533; 6.919.433; 6.919.078; 6.916.475; 6.905.681; 6.899.879; 6.893.625; 6.887.468; 6.887.466; 6.884.594; 6.881.405; 6.878.812; 6.875.580; 6.872.568; 6.867.006; 6.864.062; 6.861.511; 6.861.227; 6.861.226; 6.838.282; 6.835.549; 6.835.370; 6.824.780; 6.824.778; 6.812.206; 6.793.924; 6.783.758; 6.770.450; 6.767.711; 10 6.764.688; 6.764.681; 6.764.679; 6.743.898; 6.733.981; 6.730.307; 6.720.155; 6.716.966; 6.709.653; 6.693.176; 6.692.908; 6.689.607; 6.689.362; 6.689.355; 6.682.737; 6.682.736; 6.682.734; 6.673.344; 6.653.104; 6.652.852; 6.635.482; 6.630.144; 6.610.833; 6.610.294; 6.605.441; 6.605.279; 6.596.852; 6.592.868; 6.576.745; 6.572.856; 6.566.076; 6.562.618; 6.545.130; 6.544.749; 6.534.058; 6.528.625; 6.528.269; 6.521.227; 6.518.404; 6.511.665; 6.491.915; 6.488.930; 6.482.598; 6.482.408; 6.479.247; 6.468.531; 6.468.529; 6.465.173; 6.461.823; 6.458.356; 15 6.455.044; 6.455.040; 6.451.310; 6.444.206; 6.441.143; 6.432.404; 6.432.402; 6.419.928; 6.413.726; 6.406.694; 6.403.770; 6.403.091; 6.395.276; 6.395.274; 6.387.350; 6.383.759; 6.383.484; 6.376.654; 6.372.215; 6.359.126; 6.355.481; 6.355.444; 6.355.245; 6.355.244; 6.346.246; 6.344.198; 6.340.571; 6.340.459; 6.331.175; 6.306.393; 6.254.868; 6.187.287; 6.183.744; 6.129.914; 6.120.767; 6.096.289; 6.077.499; 5.922.302; 5.874.540; 5.814.440; 5.798.229; 5.789.554; 5.776.456; 5.736.119; 5.716.595; 5.677.136; 5.587.459; 5.443.953; 5.525.338. Estos son sólo ejemplares y en la técnica se conoce una amplia variedad de anticuerpos distintos y sus hibridomas. El experto en la técnica se percatará de que las secuencias de anticuerpos o los hibridomas secretores de anticuerpos contra casi cualquier antígeno asociado a una enfermedad, pueden obtenerse mediante una búsqueda sencilla en la ATCC, en las bases de datos del NCBI y/o USPTO para anticuerpos contra una diana de interés asociada a una enfermedad seleccionada. Los dominios de unión a antígeno de los anticuerpos clonados pueden amplificarse, escindirse, ligarse 25 en un vector de expresión, transfectarse en una célula hospedadora adaptada y utilizarse para la producción de proteínas, utilizando técnicas estándar bien conocidas en la materia (véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos N° 7.531.327; 7.537.930; 7.608.425 y 7.785.880).

Los anticuerpos particulares que pueden ser de utilidad dentro del alcance de los métodos reivindicados incluyen, pero sin limitación, LL1 (anti-CD74), LL2 o RFB4 (anti-CD22), veltuzumab (hA20, anti-CD20), rituxumab (anti-CD20), 30 obinutuzumab (GA101, anti-CD20), lambrolizumab (anti-receptor de PD-1), nivolumab (anti-receptor de PD-1), ipilimumab (anti-CTLA-4), RS7 (anti-glucoproteína-1 epitelial (EGP-1, también conocido como TROP-2)), PAM4 o KC4 (ambos anti-mucina), MN-14 (anti-antígeno carcinoembrionario (CEA, también conocido como CD66e o CEACAM5), MN-15 o MN-3 (anti-CEACAM6), Mu-9 (anti-antígeno p específico de colon), Immu 31 (un anti-alfa-fetoproteína), R1 (anti-IGF-1R), A19 (anti-CD19), IMM-U2B (anti-H2B), IMM-U-H3 (anti-H3), IMM-U-H4 (anti-H4), TAG-72 (p. ej., CC49), 35 Tn, J591 o HuJ591 (anti-PSMA (antígeno de membrana específico de próstata)), AB-PG1-XG1-026 (anti-dímero de PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (un MAb anti-anhidrasa carbónica IX), L243 (anti-HLA-DR), alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab tiuxetan (anti-CD20); panitumumab (anti-EGFR); tositumomab (anti-CD20); PAM4 (también conocido como clivatuzumab, anti-mucina) y trastuzumab (anti-ErbB2). Dichos anticuerpos son conocidos en la técnica (p. ej., patentes de Estados Unidos N° 5.686.072; 5.874.540; 6.107.090; 6.183.744; 6.306.393; 6.653.104; 6.730.300; 6.899.864; 6.926.893; 6.962.702; 7.074.403; 7.230.084; 7.238.785; 7.238.786; 7.256.004; 7.282.567; 7.300.655; 7.312.318; 7.585.491; 7.612.180; 7.642.239; y publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20050271671; 20060193865; 20060210475; 20070087001; solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 14/180 646.) Como anticuerpos 40 específicos conocidos de utilidad se incluyen hPAM4 (patente de Estados Unidos N° 7.282.567), hA20 (patente de Estados Unidos N° 7.251.164), hA19 (patente de Estados Unidos N° 7.109.304), hIMMU-31 (patente de Estados Unidos N° 7.300.655), hLL1 (patente de Estados Unidos N° 7.312.318), hLL2 (patente de Estados Unidos N° 7.074.403), hMu-9 (patente de Estados Unidos N° 7.387.773), hL243 (patente de Estados Unidos N° 7.612.180), hMN-14 (patente de Estados Unidos N° 6.676.924), hMN-15 (patente de Estados Unidos N° 7.541.440), hR1 (solicitud de patente de Estados Unidos 12/772.645), hRS7 (patente de Estados Unidos N° 7.238.785), hMN-3 (patente de Estados Unidos N° 7.541.440), AB-PG1-XG1-026 (solicitud de patente de Estados Unidos 11/983.372, depositado en la ATCC como PTA-4405 y PTA-4406) y D2/B (documento WO 2009/130575).

Otros antígenos útiles que pueden ser dirigidos utilizando los conjugados descritos incluyen anhidrasa carbónica IX, 55 alfafetoproteína (AFP),  $\alpha$ -actinina-4, A3, antígeno específico para el anticuerpo A33, ART-4, B7, Ba 733, BAGE, antígeno BrE3, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8/m, CCL19, CCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD132, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1 $\alpha$ , antígeno p específico de colon (CSAp), CEACAM5, CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, receptor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Flt-1, Flt-3, 60 receptor de folato, antígeno G250, GAGE, gp100, GRO- $\beta$ , histona H2B, histona H3, histona H4, HLA-DR, HM1.24, gonadotropina coriónica humana (HCG) y sus subunidades, HER2/neu, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2, Ia, IGF-1R, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ , 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-23, IL-25, factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), antígeno KC4, antígeno KS-1, KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, factor inhibidor de la migración de macrófagos (FIM), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-

- 5 ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, FIM, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, antígeno PAM 4, mucina de cáncer pancreático, PD-1, PD-L1, receptor de PD-1, factor de crecimiento placentario, p53, PLAGL2, fosfatasa ácida prostática, PSA, PRAME, PSMA, PIGF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, S100, survivina, survivina-2B, TAC, TAG-72, tenascina, receptores de TRAIL, TNF-a, antígeno Tn, antígenos de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, VEGFR, fibronectina ED-B, WT-1, antígeno 17-1A, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, un marcador de angiogénesis, bcl-2, bcl-6, Kras, un marcador oncogénico y un producto oncogénico (véase, p. ej., Sensi *et al.*, Clin Cancer Res 2006, 12:5023-32; Parmiani *et al.*, J Immunol 2007, 178:1975-79; Novellino *et al.* Cancer Immunol Immunother 2005, 54:187-207).
- 10 Un análisis completo de dianas antigénicas adecuadas (designación de grupo o DG) en células neoplásicas hematopoyéticas, como se muestra mediante citometría de flujo y que puede ser una guía para seleccionar anticuerpos adecuados para la inmunoterapia conjugada con fármacos, es el de Craig y Foon, Blood publicado anteriormente en línea el 15 de enero de 2008; DOL 10.1182/blood-2007-11-120535.
- 15 Los antígenos CD66 consisten en cinco glucoproteínas diferentes con estructuras similares, CD66a-e, codificados por los miembros de la familia de genes de antígeno carcinoembrionario (CEA, siglas del inglés *carcinoembryonic antigen*), BCG, CGM6, NCA, CGM1 y CEA, respectivamente. Estos antígenos CD66 (p. ej., CEACAM6) se expresan principalmente en granulocitos, células epiteliales normales del tubo digestivo y células tumorales de varios tejidos. También se incluyen como dianas adecuadas para cánceres los antígenos de cáncer de testículo, tales 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 linfoma no Hodgkin (Poison *et al.*, Blood 110 (2): 616-623). Varios de los antígenos mencionados anteriormente se describen en la solicitud provisional de Estados Unidos N° de serie 60/426.379, titulada "Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics", presentada el 15 de noviembre de 2002. Las células madre cancerosas, que se atribuyen a poblaciones de células precursoras neoplásicas más resistentes a la terapia (Hill y Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99: 1435-40), tienen antígenos que pueden dirigirse a algunos tipos de cáncer, tal como CD133 en el cáncer de próstata (Maitland *et al.*, Ernst Schering Found. Sympos. Proc. 2006; 5: 155-79), cáncer de pulmón no microcítico (Donnenberg *et al.*, J. Control Release 2007; 122 (3): 385-91) y glioblastoma (Beier *et al.*, Cancer Res. 2007; 67(9):4010-5) y CD44 en cáncer colorrectal (Dalerba *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(24):10158-63), cáncer pancreático (Li *et al.*, Cancer Res. 2007; 67(3):1030-7) y en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Prince *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(3):973-8). Otra diana útil para la terapia del cáncer de mama es el antígeno LIV-1 descrito por Taylor. *et al.* (Biochem. J. 2003; 375:51-9).
- 25 Para la terapia del mieloma múltiple, se han descrito anticuerpos diana 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 2008; 112 (4): 1329-37 y CD40 (Tai *et al.*, 2005; Cancer Res. 65(13):5898-5906).
- 35 El factor inhibidor de la migración de macrófagos (FIM) es un regulador importante de la inmunidad innata y adaptativa y la apoptosis. Se ha informado que CD74 es el receptor endógeno de FIM (Leng *et al.*, 2003, J Exp Med 197:1467-76). El efecto terapéutico de los anticuerpos anti-CD74 antagonistas sobre las rutas intracelulares mediadas por FIM puede ser útil para el tratamiento de una amplia gama de patologías, tales como cánceres de vejiga, próstata, mama, pulmón, colon y leucemia linfocítica crónica (p. ej., Meyer-Siegler *et al.*, 2004, BMC Cancer 12:34; Shachar & Haran, 2011, Leuk Lymphoma 52:1446-54); enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico (Morand & Leech, 2005, Front Biosci 10:12-22; Shachar & Haran, 2011, Leuk Lymphoma 52:1446-54); enfermedades renales tales como rechazo de aloinjerto renal (Lan, 2008, Nephron Exp Nephrol. 109:e79-83); y numerosas enfermedades inflamatorias (Meyer-Siegler *et al.*, 2009, Mediators Inflamm epub March 22, 2009; Takahashi *et al.*, 2009, Respir Res 10:33; Milatuzumab (hLL1) es un anticuerpo anti-CD74 ejemplar de uso terapéutico para el tratamiento de enfermedades mediadas por FIM.
- 40 Los anticuerpos anti-TNF-a son conocidos en la técnica y pueden ser útiles para tratar enfermedades inmunitarias, tal como enfermedad autoinmunitaria, disfunción inmunitaria (p. ej., enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de trasplante de órgano) o diabetes. Los anticuerpos conocidos contra TNF-a incluyen el anticuerpo humano CDP571 (Ofei *et al.*, 2011, Diabetes 45:881-85); anticuerpos murinos MTNFAl, M2TNFAl, M3TNFAl, M3TNFAl, M302B y M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL); infliximab (Centocor, Malvern, PA); certolizumab pegol (UCB, Bruselas, Bélgica); y adalimumab (Abbott, Abbott Park, IL). Estos y muchos otros anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  conocidos pueden utilizarse en los métodos y composiciones que se reivindican. Otros anticuerpos de utilidad para la terapia de enfermedades de desregulación del sistema inmunitario o autoinmunitario incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti-células B, tales como veltuzumab, epratuzumab, milatuzumab o hL243; tocilizumab (anti-receptor de IL-6);
- 55 basiliximab (anti-CD25); daclizumab (anti-CD25); efalizumab (anti-CD11a); muromonab-CD3 (anti-receptor de CD3); anti-CD40L (UCB, Bruselas, Bélgica); natalizumab (anti-integrina  $\alpha 4$ ) y omalizumab (anti-IgE).
- Los anticuerpos inhibidores de puntos de control se han utilizado principalmente en la terapia del cáncer. Los puntos de control inmunitario se refieren a las rutas inhibidoras en el sistema inmunitario que son responsables de mantener la auto tolerancia y modular el grado de respuesta del sistema inmunitario para minimizar el daño al tejido periférico.
- 60 Sin embargo, las células tumorales también pueden activar los puntos de control del sistema inmunitario para disminuir la eficacia de la respuesta inmunitaria contra los tejidos tumorales. Ejemplos de anticuerpos inhibidores de puntos de

control contra el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4, también conocido como CD 152), la proteína 1 de muerte celular programada (PD1, también conocida como CD279) y el ligando 1 de muerte celular programada 1 (PD-L1, también conocido como CD274), pueden utilizarse en combinación con uno o más agentes distintos para mejorar la eficacia de la respuesta inmunitaria contra las células, los tejidos o los patógenos de la enfermedad. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD1 incluyen lambrolizumab (MK-3475, MERCK), nivolumab (BMS-936558, BRISTOL-MYERS SQUIBB), AMP-224 (MERCK) y pidilizumab (CT-011, CURETECH LTD.). Los anticuerpos anti-PD1 están disponibles en el comercio, por ejemplo en ABCAM® (AB137132), BIOLEGEND® (EH12.2H7, RMP1-14) and AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (J105, J116, MIH4). Los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares incluyen MDX-1105 (MEDAREX), MEDI4736 (MEDIMMUNE) MPDL3280A (GENENTECH) y BMS-936559 (BRISTOL-MYERS SQUIBB). Los anticuerpos anti-PD-LI también están disponibles en el comercio, por ejemplo en AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (MIH1). Los anticuerpos anti-CTLA4 ejemplares incluyen ipilimumab (Bristol-Myers Squibb) y tremelimumab (PFIZER). Los anticuerpos anti-PD1 están disponibles en el comercio, por ejemplo en ABCAM® (AB134090), SINO BIOLOGICAL INC. (11159-H03H, 11159-H08H) y THERMO SCIENTIFIC PIERCE (PA5-29572, PA5-23967, PA5-26465, MA1-12205, MA1-35914). Ipilimumab ha recibido recientemente la aprobación de la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico (Wada *et al.*, 2013, J Transl Med 11:89).

En otra realización preferida de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, se utilizan anticuerpos que se internalizan rápidamente y que después se reexpresan, procesan y presentan en las superficies celulares, permitiendo que la célula absorba y acumule de manera continuada el conjugado circulante. Un ejemplo de un par de anticuerpo/antígeno más preferido es LL1, un MAb anti-CD74 (cadena invariante, chaperón específico de clase II, li) (véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos N° 6.653.104; 7.312.318). El antígeno CD74 se expresa sumamente en linfomas (incluido el mieloma múltiple) y en leucemias de células B, algunos linfomas de células T, melanomas, cánceres de colon, pulmón y riñón, glioblastomas y algunos otros cánceres (Ong *et al.*, Immunology 98: 296-302 (1999)). En Stein *et al.*, Clin Cancer Res. 15 de sep. de 2007;13(18 Pt 2):5556s-5563s, se incluye una revisión del uso de anticuerpos CD74 en el cáncer.

Las enfermedades que se tratan preferiblemente con anticuerpos anti-CD74 incluyen, pero sin limitación, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, melanoma, cánceres de pulmón, riñón y colon, glioblastoma multiforme, histiocitomas, leucemias mieloides y mieloma múltiple. La expresión continua del antígeno CD74 durante breves períodos de tiempo en la superficie de las células diana, seguida de la internalización del antígeno y la reexpresión del mismo, permite internalizar el anticuerpo LL1 diana junto con cualquier fracción quimioterapéutica que lleve consigo. Esto permite que en el interior de dichas células se acumule una alta, y terapéutica, concentración de conjugado farmacológico terapéutico LL1. Los conjugados farmacológicos quimioterapéuticos LL1 internalizados se ciclan a través de lisosomas y endosomas, y la fracción quimioterapéutica se libera en una forma activa en el interior de las células diana.

Los conjugados terapéuticos preparados de acuerdo con la invención, tal como se define en las reivindicaciones, pueden utilizarse contra patógenos, ya que se conocen anticuerpos contra patógenos. Por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a marcadores producidos por lesiones infecciosas o asociados a ellas, incluyendo infecciones víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias, por ejemplo, causadas por patógenos tales como bacterias, rickettsias, micoplasma, protozoos, hongos y virus, y se han descrito antígenos y productos asociados a dichos microorganismos, entre otros, en Hansen *et al.*, patente de Estados Unidos N° 3.927.193 y en las patentes de Estados Unidos de Goldenberg 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, anteriormente citados. En Casadevall, Clin Immunol 1999; 93(1):5-15, se incluye una revisión que enumera anticuerpos contra organismos infecciosos (anticuerpos antitoxina y antivíricos), así como otras dianas.

En una realización preferida, los patógenos se seleccionan del grupo que consiste en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemofilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, virus de la rabia, virus de la gripe, citomegalovirus, virus del herpes simple I, virus del herpes simple II, virus parvovírico en suero humano, virus respiratorio sincicial, virus de la varicela zoster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del sarampión, adenovirus, virus de la leucemia humana de células T, virus de Epstein Barr, virus de la leucemia murina, virus de las paperas, virus de la estomatitis vesicular, virus sindbis, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus verrucoso, virus de la lengua azul, virus de Sendai, virus de la leucemia felina, reovirus, virus de la polio, virus de simio 40, virus del tumor mamario del ratón, virus del dengue, virus de la rubéola, virus del Nilo Occidental, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Babesia bovis*, *Elmeria tenella*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania tropica*, *Trichinella spiralis*, *Theileria parva*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti*, *Mycoplasma artritidis*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laylawii*, *M. salivarium* y *M. pneumoniae*, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.440.416.

En una realización más preferida, los conjugados farmacológicos de la presente invención que comprenden anticuerpos anti-gp120 y otros anticuerpos anti-VIH de este tipo, pueden utilizarse como agentes terapéuticos para el VIH en pacientes con SIDA; y los conjugados farmacológicos de anticuerpos contra *Mycobacterium tuberculosis* son

5 adecuados como agentes terapéuticos para la tuberculosis fármacorrefractiva. Las proteínas de fusión de MAb anti-gp120 (MAb anti VIH) y una toxina, tal como la exotoxina de *Pseudomonas*, se han examinado en busca de propiedades antivíricas (Van Oigen *et al.*, J Drug Target, 5:75-91, 1998). Los intentos de tratar la infección por VIH en  
 10 pacientes con SIDA fracasaron, posiblemente debido a una eficacia insuficiente o a una toxicidad inaceptable del hospedador. Los conjugados farmacológicos de CPT de la presente invención carecen ventajosamente de dichos efectos secundarios tóxicos de las toxinas proteicas y, por lo tanto, se usan ventajosamente en el tratamiento de la infección por el VIH en pacientes con SIDA. Estos conjugados farmacológicos pueden administrarse solos o en combinación con otros antibióticos o agentes terapéuticos que son eficaces en dichos pacientes cuando se suministran solos. Como anticuerpos anti-VIH candidatos se incluyen el anticuerpo anti-envoltura P4/D10 descrito por Johansson  
 15 *et al.* (AIDS. 3 de oct. de 2006; 20(15):1911-5), así como los anticuerpos anti-VIH descritos y comercializados por Polymun (Viena, Austria), que también se describen en la patente de Estados Unidos 5 831 034, patente de Estados Unidos 5 911 989 y Vcelar *et al.*, AIDS 2007; 21(16):2161-2170 y Joos *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50(5):1773-9. Un agente de direccionamiento preferido para el VIH son varias combinaciones de estos anticuerpos para superar la resistencia.

15 En la técnica se conocen anticuerpos de utilidad para tratar enfermedades autoinmunitarias o disfunciones del sistema inmunitario (p. ej., enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de trasplante de órganos) y pueden conjugarse con CL2A-SN-38 utilizando los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. Los anticuerpos de utilidad para tratar enfermedades autoinmunitarias/disfunciones inmunitarias, pueden unirse a antígenos  
 20 ejemplares, que incluyen, pero sin limitación, BCL-1, BCL-2, BCL-6, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD34, CD38, CD40, CD40L, CD41a, CD43, CD45, CD55, TNF-alfa, interferón, IL-6 y HLA-DR. Anticuerpos que se unen a estos y otros antígenos diana, comentados anteriormente, pueden utilizarse para tratar enfermedades autoinmunitarias o disfunciones inmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse con inmunoconjugados pueden  
 25 incluir púrpura trombocitopénica idiopática aguda, púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, corea de Sydenham, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide ampolloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nodular, arteritis de Takayasu, vasculitis asociadas a ANCA, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía por IgA, panarteritis nodular, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, síndrome de Sjogren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis activa crónica, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis o alveolitis fibrosante.

30 Los anticuerpos indicados anteriormente y otros anticuerpos conocidos contra antígenos asociados a enfermedades, pueden utilizarse como inmunoconjugados CL2A-SN-38.

#### Anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son útiles en diversas aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico con sitios de unión para un antígeno de superficie de células tumorales y para un receptor de superficie de células T puede dirigir la lisis de células tumorales específicas por células T. Anticuerpos biespecíficos que reconocen gliomas  
 40 y el epítipo CD3 en células T, se han utilizado satisfactoriamente en el tratamiento de tumores cerebrales en pacientes humanos (Nitta, *et al.* Lanceta. 1990; 355:368-371). En algunas realizaciones de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, en la preparación del inmunoconjugado pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos como fracciones de anticuerpo.

45 Se conocen numerosos métodos para producir anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 7.405.320. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante el método del cuadro, que implica la fusión de dos hibridomas diferentes, produciendo cada uno de ellos un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio antigénico diferente (Milstein y Cuello, Nature, 1983; 305:537-540).

Otro método para producir anticuerpos biespecíficos utiliza reticulantes heterobifuncionales para unir químicamente dos anticuerpos monoclonales diferentes (Staerz, *et al.* Nature 1985; 314:628-631; Perez, *et al.* Nature 1985; 316:354-356). También pueden producirse anticuerpos biespecíficos mediante la reducción de cada uno de los dos anticuerpos monoclonales precursores en las respectivas hemimoléculas, que después 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 entrecruzar químicamente dos o tres fragmentos Fab' purificados por separado utilizando enlazadores apropiados. (Véase, p. ej., la solicitud de patente Europea 0453082).

55 Otros métodos incluyen mejorar la eficacia de generación de hibridomas híbridos mediante transferencia génica de marcadores seleccionables distintos mediante vectores lanzadera procedentes de retrovirus en los respectivos hibridomas precursores, que posteriormente se fusionan (DeMonte, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 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.

Los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> afines se pueden unir con un enlazador peptídico de composición y longitud apropiadas (que normalmente consta de más de 12 restos de aminoácidos) para formar un Fv monocatenario (scFv) con actividad de unión. En las patentes de Estados Unidos N.º 4.946.778 y 5.132.405 se describen métodos de fabricación de scFv. La reducción de la longitud del enlazador peptídico a menos de 12 restos de aminoácidos, impide el emparejamiento de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> en la misma cadena y obliga a emparejarse a los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> con dominios complementarios en otras cadenas, dando como resultado la formación de multímeros funcionales. Cadenas polipeptídicas de dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que están unidas con enlazadores entre 3 y 12 restos de aminoácidos forman predominantemente dímeros (denominados diacuerpos). Con enlazadores entre 0 y 2 restos de aminoácidos, se favorecen los trímeros (denominados triacuerpos) y los tetrámeros (denominados tetracuerpos), pero los patrones exactos de oligomerización parecen depender de la composición así como de la orientación de los dominios V (V<sub>H</sub>-enlazador-V<sub>L</sub> o V<sub>L</sub>-enlazador-V<sub>H</sub>), además de la longitud del enlazador.

Estas técnicas de producción de anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos presentan diversas dificultades en cuanto a bajo rendimiento, necesidad de purificación, baja estabilidad o la laboriosidad de la técnica. Más recientemente, se han utilizado construcciones biespecíficas conocidas como "DOCK-AND-LOCK™" (DNL™) para producir combinaciones de prácticamente cualquier anticuerpo, fragmentos de anticuerpo y otras moléculas efectoras que se desee (véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos N.º 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 complementarias, denominados dominios de anclaje (AD, *anchoring domains*) y dominios de dimerización y acoplamiento (DDD, *dimerization and docking domains*), que se unen entre sí y permiten el ensamblaje de estructuras complejas, que varían de dímeros, trímeros, tetrámeros, quintámeros y hexámeros. Estos forman complejos estables con alto rendimiento sin necesidad de una purificación extensa. La técnica permite el ensamblaje de anticuerpos mono-específicos, biespecíficos o multiespecíficos. Cualquiera de las técnicas conocidas en la materia para preparar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos puede utilizarse en la práctica de los métodos actualmente reivindicados.

Combinaciones de uso, como las que se prefieren para las terapias contra el cáncer, incluyen anticuerpos CD20 + CD22, anticuerpos CD74 + CD20, anticuerpos CD74 + CD22, anticuerpos CEACAM5 (CEA) + CEACAM6 (NCA), factor de crecimiento insulínico (ILGF) + anticuerpos CEACAM5, EGP-1 (p. ej., RS-7) + anticuerpos ILGF, anticuerpos CEACAM5 + EGFR. Dichos anticuerpos no solo deben utilizarse en combinación, sino que pueden combinarse como proteínas de fusión de varias formas, tales como IgG, Fab, scFv y similares, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.083.477; 6.183.744 y 6.962.702 y en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20030124058; 20030219433; 20040001825; 20040202666; 20040219156; 20040219203; 20040235065; 20050002945; 20050014207; 20050025709; 20050079184; 20050169926; 20050175582; 20050249738; 20060014245 y 20060034759.

### Predireccionamiento

También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos en técnicas de predireccionamiento. El predireccionamiento es un proceso multietapa desarrollado originalmente para solucionar la lenta eliminación en la sangre de los anticuerpos directamente direccionados, lo que contribuye a una toxicidad indeseable a los tejidos normales tales como la médula ósea. Con el predireccionamiento, un radionúclido u otro agente terapéutico se une a una pequeña molécula de suministro (construcción direccionable) que se elimina de la sangre en minutos. Un anticuerpo biespecífico o multiespecífico de predireccionamiento, que tiene sitios de unión para la construcción direccionable, así como un antígeno diana, se administra primero, se deja que el anticuerpo libre se elimine de la circulación y después se administra la construcción direccionable.

Se divulgan métodos de predireccionamiento, por ejemplo, en Goodwin *et al.*, patente de Estados Unidos N.º 4.863.713; Goodwin *et al.*, J. Nucl. Med. 29:226, 1988; Hnatowich *et al.*, J. Nucl. Med. 28:1294, 1987; Oehr *et al.*, J. Nucl. Med. 29:728, 1988; Klibanov *et al.*, J. Nucl. Med. 29:1951, 1988; Sinitsyn *et al.*, J. Nucl. Med. 30:66, 1989; Kalofonos *et al.*, J. Nucl. Med. 31:1791, 1990; Schechter *et al.*, Int. J. Cancer 48:167, 1991; Paganelli *et al.*, Cancer Res. 51:5960, 1991; Paganelli *et al.*, Nucl. Med. Commun. 12:211, 1991; patente de Estados Unidos N.º 5.256.395; Stickney *et al.*, Cancer Res. 51:6650, 1991; Yuan *et al.*, Cancer Res. 51:3119, 1991; patentes de Estados Unidos N.º 6.077.499; 7.011.812; 7.300.644; 7.074.405; 6.962.702; 7.387.772; 7.052.872; 7.138.103; 6.090.381; 6.472.511; 6.962.702; y 6,962,702.

Un método de predireccionamiento para tratar o diagnosticar una enfermedad o trastorno en un sujeto puede proporcionarse mediante: (1) la administración al sujeto de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo biespecífico; (2) opcionalmente, la administración al sujeto de una composición limpiadora y permitir que la composición elimine el anticuerpo de la circulación; y (3) la administración al sujeto de la construcción direccionable, que contiene uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico quelados o unidos químicamente, tal como SN-38.

### Construcciones direccionables

En algunas realizaciones de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, pueden seleccionarse péptidos de construcción direccionables, marcados con uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico para su uso en el predireccionamiento para unirse a un anticuerpo biespecífico con uno o más sitios de unión para un péptido de construcción direccionable y uno o más sitios de unión para un antígeno diana asociado a una enfermedad o afección.

En una técnica de predireccionamiento, en la que el anticuerpo puede administrarse primero a un sujeto, pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos. Puede dejarse tiempo suficiente para que el anticuerpo biespecífico se una a un antígeno diana y para que el anticuerpo no unido se elimine de la circulación. Después, una construcción direccionable, tal como un péptido marcado, puede administrarse al sujeto y dejar que se una al anticuerpo biespecífico y se localice en la célula o tejido enfermo.

Dichas construcciones direccionables pueden tener una estructura diversa y se seleccionan no solo por la disponibilidad de un anticuerpo o fragmento que se une con alta afinidad a la construcción direccionable, sino también para una rápida eliminación *in vivo* cuando se utilizan en el método de predireccionamiento y de anticuerpos biespecíficos (bsAb) o multiespecíficos. Los agentes hidrófobos son mejores a la hora provocar fuertes respuestas inmunitarias, mientras que para la eliminación *in vivo* se prefieren agentes hidrófilos. Por tanto, se establece un equilibrio entre el carácter hidrófobo e hidrófilo. Esto puede realizarse, en parte, utilizando agentes quelantes hidrófilos para compensar la hidrofobicidad intrínseca de muchas fracciones orgánicas. Además, pueden elegirse subunidades de la construcción direccionable que tengan propiedades de solución opuestas, por ejemplo, péptidos, que contienen aminoácidos, algunos de los cuales son hidrófobos y algunos de los cuales son hidrófilos.

Pueden utilizarse péptidos que tengan tan solo dos restos de aminoácidos, preferiblemente de dos a diez restos y también pueden acoplarse a otras fracciones, tales como agentes quelantes. El enlazador debe ser un conjugado de bajo peso molecular, preferiblemente con un peso molecular inferior a 50 000 daltons y ventajosamente inferior a aproximadamente 20 000 daltons, 10 000 daltons o 5 000 daltons. Más habitualmente, el péptido de construcción direccionable tendrá cuatro o más restos y uno o más haptenos para unirse, p. ej., a un anticuerpo biespecífico. Los ejemplos de haptenos pueden incluir In-DTPA (ácido indio-dietilentriaminopentaacético) o HSG (histamina succinil glicina). La construcción direccionable también puede comprender una o más fracciones quelantes, tales como DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), NOTA (ácido 1,4,7-triaza-ciclononano-1,4,7-triacético), TETA (ácido p-bromoacetamido-bencil-tetraetilaminotetraacético), NETA (ácido[2-(4,7-biscarboximetil[1,4,7]triazaciclonoan-1-il-etil]-2-carbonilmetil-amino]acético) u otras fracciones quelantes conocidas. Las fracciones quelantes pueden utilizarse, por ejemplo, para unirse a un radionúclido terapéutico o de diagnóstico, a un ion paramagnético o a un agente de contraste.

La construcción direccionable también puede comprender aminoácidos no naturales, p. ej., D-aminoácidos, en la estructura principal para aumentar la estabilidad del péptido *in vivo*. En realizaciones alternativas, pueden utilizarse otras estructuras principales tales como las construidas a partir de aminoácidos no naturales o peptoides.

Los péptidos utilizados como construcciones direccionables se sintetizan convenientemente en un sintetizador de péptidos automatizado utilizando un soporte en fase sólida y técnicas estándar de desprotección ortogonal repetitiva y acoplamiento. Los grupos amino libres en el péptido, que se utilizarán posteriormente para la conjugación de fracciones quelantes u otros agentes, se bloquean ventajosamente con grupos protectores estándar tales como un grupo Boc, mientras que los restos N-terminales pueden acetilarse para aumentar la estabilidad en suero. El experto en la técnica conoce bien dichos grupos protectores. Véase Greene and Wuts Protective Groups in Organic Synthesis, 1999 (John Wiley and Sons, N.Y.). Cuando los péptidos se preparan para su uso posterior dentro del sistema de anticuerpos biespecíficos, ventajosamente se escinden de las resinas para generar las correspondientes amidas C-terminales, para inhibir *in vivo* la actividad carboxipeptidasa.

Cuando se utilice el predireccionamiento con anticuerpos biespecíficos, el anticuerpo contendrá un primer sitio de unión para un antígeno producido por o asociado a un tejido diana y un segundo sitio de unión para un hapteno en la construcción direccionable. Los haptenos ejemplares incluyen, pero sin limitación, HSG e In-DTPA. Se conocen anticuerpos producidos contra el hapteno HSG (p. ej., anticuerpo 679) y pueden incorporarse fácilmente en el anticuerpo biespecífico apropiado (véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos N° 6.962.702; 7.138.103 y 7.300.644). Sin embargo, en la técnica se conocen otros haptenos y anticuerpos que se unen a ellos y que pueden utilizarse, tales como In-DTPA y el anticuerpo 734 (p. ej., patente Estados Unidos N° 7.534.431).

#### **DOCK-AND-LOCK™ (DNL™)**

En realizaciones preferidas de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, un anticuerpo bivalente o multivalente se forma como un complejo DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) (véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos N° 7.521.056; 7.527.787; 7.534.866; 7.550.143 y 7.666.400.) En general, la técnica aprovecha las interacciones de unión específicas y de alta afinidad que se producen entre una secuencia del dominio de dimerización y acoplamiento (DDD) de las subunidades reguladoras (R) de la proteína cinasa (PKA) dependiente de AMPc y una secuencia de dominio de anclaje (AD) procedente de cualquiera de una variedad de proteínas AKAP (Baillie *et al.*, FEBS Letters. 2005; 579: 3264. Wong y Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959). Los péptidos DDD y AD pueden unirse a cualquier proteína, péptido u otra molécula. Dado que las secuencias de DDD se dimerizan espontáneamente y se unen a la secuencia de AD, la técnica permite la formación de complejos entre cualquier molécula seleccionada que pueda unirse a las secuencias de DDD o AD.

Aunque el complejo DNL™ estándar comprende un trímero con dos moléculas ligadas a DDD unidas a una molécula ligada a AD, las variaciones en la estructura del complejo compleja permiten la formación de dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros y otros multímeros. En algunas realizaciones, el complejo DNL™ puede

comprender dos o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o proteínas de fusión que se unen al mismo determinante antigénico o a dos o más antígenos diferentes. El complejo DNL™ también puede comprender uno o más efectores distintos, tales como proteínas, péptidos, inmunomoduladores, citocinas, interleucinas, interferones, proteínas de unión, ligandos peptídicos, proteínas transportadoras, toxinas, ribonucleasas tales como onconasa, oligonucleótidos inhibidores tales como ARNip, antígenos o xenoantígenos, polímeros tales como PEG, enzimas, agentes terapéuticos, hormonas, agentes citotóxicos, agentes anti-angiogénicos, agentes proapoptóticos o cualquier otra molécula o agregado.

La PKA, que desempeña un papel importante en una de las rutas de transducción de señales mejor estudiadas desencadenadas por la unión del AMPc del segundo mensajero 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 consiste en dos subunidades catalíticas mantenidas en 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 las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  (Scott, Pharmacol. Ther. 1991;50:123). Por tanto, las cuatro isoformas de las subunidades reguladoras de la PKA son RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  y RII $\beta$ . Las subunidades R se han aislado solo como dímeros estables y se ha demostrado que el dominio de dimerización consiste en los 44 primeros restos amino-terminales de RII $\alpha$  (Newlon *et al.*, Nat. Struct. Biol. 1999; 6:222). Como se analiza a continuación, partes similares de las secuencias de aminoácidos de otras subunidades reguladoras están implicadas en la dimerización y el acoplamiento, cada una de ellas ubicada cerca del extremo N-terminal de la subunidad reguladora. 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 cinasa, que están orientadas hacia sustratos seleccionados a través de la compartimentación de la PKA a través de su acoplamiento con las proteínas AKAP (Scott *et al.*, J. Biol. Chem. 1990;265:21561)

Desde que en 1984 se caracterizó la primera AKAP, la proteína 2 asociada a microtúbulos, (Lohmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1984; 81: 6723), se han identificado más de 50 AKAP que se ubican en varios sitios subcelulares, incluida la membrana plasmática, el citoesqueleto de actina, el núcleo, las mitocondrias y el retículo endoplásmico, con diversas estructuras en especies que van desde levaduras hasta seres humanos (Wong y Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004;5:959). El AD de las AKAP para la PKA es una hélice anfipática de 14-18 restos (Carr *et al.*, J. Biol. Chem. 1991;266:14188). Las secuencias de aminoácidos del AD son bastante variadas entre las AKAP individuales, presentándose afinidades de unión para los dímeros RII que varían de 2 a 90 nM (Alto *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100:4445). Las proteínas AKAP solo se unen a subunidades R dimerizadas. Para la RII  $\alpha$  humana, el AD se une a una superficie hidrófoba formada por los 23 restos amino-terminales (Colledge y Scott, Trends Cell Biol. 1999; 6:216). Por tanto, el dominio de dimerización y el dominio de unión de la RII $\alpha$  de la AKAP humana, están ubicados dentro de la misma secuencia de 44 aminoácidos N-terminales (Newlon *et al.*, Nat. Struct. Biol. 1999;6:222; Newlon *et al.*, EMBO J. 2001; 20: 1651), que en la presente memoria se denomina DDD.

Los autores de la invención han desarrollado una tecnología de plataforma para utilizar el DDD de las subunidades reguladoras de la PKA humana y el AD de la AKAP como un excelente par de módulos enlazadores para acoplar dos entidades cualesquiera, denominados en lo sucesivo A y B, en un complejo no covalente, que podría acoplarse adicionalmente en un complejo DNL™ a través de la introducción de restos de cisteína tanto en el DDD como en el AD en posiciones estratégicas para facilitar la formación de enlaces disulfuro. La metodología general del enfoque es la siguiente. La entidad A se construye ligando una secuencia de DDD con un precursor de A, dando como resultado un primer componente denominado en lo sucesivo a. Dado que la secuencia de DDD efectuaría la formación espontánea de un dímero, la entidad A estaría compuesta por a<sub>2</sub>. La entidad B se construye ligando una secuencia de AD con un precursor de B, dando como resultado un segundo componente denominado en lo sucesivo b. El motivo dimérico de DDD contenido en a<sub>2</sub> creará un sitio de acoplamiento para unirse a la secuencia de AD contenida en b, facilitando así una asociación rápida de a<sub>2</sub> y b para formar un complejo binario, trimérico compuesto por a<sub>2</sub>b. Este suceso de unión se hace irreversible con una reacción posterior para garantizar covalentemente las dos entidades a través de puentes disulfuro, que se produce de manera muy eficaz según el principio de la concentración local efectiva ya que las interacciones de unión iniciales deberían acercar los grupos de tioles reactivos colocados tanto en el DDD como en el AD (Chmura *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98: 8480) para ligarse específicamente al sitio. Utilizando diversas combinaciones de enlazadores, módulos adaptadores y precursores, se puede producir y utilizar una amplia variedad de construcciones DNL™ de diferente estequiometría (véanse, p. ej., los documentos U.S. Nº 7.550.143; 7.521.056; 7.534.866; 7.527.787 y 7.666.400.)

Al unir el DDD y el AD lejos de los grupos funcionales de los dos precursores, también se espera que dichos ligamientos específicos de sitio conserven las actividades originales de los dos precursores. Este enfoque es de naturaleza modular y posiblemente puede aplicarse para unir, de manera específica y covalente, una amplia gama de sustancias, incluyendo péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otras fracciones efectoras con una amplia gama de actividades. Utilizando el método de proteínas de fusión para construir efectores AD y DDD conjugados que se describe más adelante en los Ejemplos, prácticamente cualquier proteína o péptido puede incorporarse en una construcción DNL™. Sin embargo, la técnica no es limitante y se pueden utilizar otros métodos de conjugación.

Se conocen diversos métodos para fabricar proteínas de fusión, incluida la síntesis de ácidos nucleicos, hibridación y/o amplificación para producir un ácido nucleico bicatenario sintético que codifica una proteína de fusión de interés. Dichos ácidos nucleicos bicatenarios pueden insertarse en vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión mediante técnicas estándar de biología molecular (véase, p. ej., Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A laboratory

manual, 2ª Ed., 1989). Preferiblemente, la fracción AD y/o DDD puede unirse al extremo N-terminal o C-terminal de una proteína efectora o péptido efector. Sin embargo, el experto en la técnica se percatará de que el sitio de unión de una fracción de AD o DDD con una fracción efectora puede variar, dependiendo de la naturaleza química de la fracción efectora y de la(s) parte(s) de la fracción efectora implicada(s) en su actividad fisiológica. La unión específica a sitio de una variedad de fracciones efectoras puede realizarse utilizando técnicas conocidas en la materia, tales como utilizando reactivos de entrecruzamiento bivalentes y/u otras técnicas de conjugación química.

*Relaciones de estructura y función en las fracciones de AD y DDD*

En los diferentes tipos de construcciones DNL™, se pueden utilizar diferentes secuencias de AD o DDD. A continuación se proporcionan ejemplos de secuencias de DDD y AD.

10 *DDD1*

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

*DDD2*

CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:2)

*AD1*

15 QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

*AD2*

CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO:4)

20 El experto en la técnica se percatará de que DDD1 y DDD2 se basan en la secuencia de DDD de la isoforma R11α de la proteína cinasa A humana. Sin embargo, en realizaciones alternativas, las fracciones de DDD y AD pueden basarse en la secuencia de DDD de la forma R1α de la proteína cinasa A humana y una secuencia AKAP correspondiente, como se ilustra en DDD3, DDD3C y AD3 a continuación.

*DDD3*

SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:5)

*DDD3C*

**MSCGGSRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEE  
AK (SEQ ID NO:6)**

25 *AD3*

CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC (SEQ ID NO:7)

30 De manera alternativa, en la construcción de los complejos DNL™ se pueden utilizar otras variantes de secuencia de fracciones de AD y/o DDD. Por ejemplo, hay solo cuatro variantes de secuencias de DDD de la PKA humana, que corresponden a las fracciones de DDD de R1α, R11α, R1β y R11β de la PKA. La secuencia de DDD de R11α es la base del DDD1 y DDD2 descritos anteriormente. A continuación se muestran las cuatro secuencias de DDD de la PKA humana. La secuencia de DDD representa los restos 1-44 de R11α, 1-44 de R11β, 12-61 de R1α y 13-66 de R1β. (Obsérvese que la secuencia de DDD1 está ligeramente modificada con respecto a la de la fracción de DDD de la R11α de la PKA humana).

35 *R1α de la PKA*

SLRECELYVQKHNIQALLKDVSIQVQLCT ARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK (SEQ ID NO:8)

*R1β de la PKA*

SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHFLEKEEENRQILA (SEQ ID NO:9)

*R11α de la PKA*

40 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVGQQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID NO:10)

*R11β de la PKA*

SIEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQENER (SEQ ID NO:11)

45 Las relaciones estructura y función de los dominios AD y DDD han sido objeto de investigación. (Véase, p. ej., Burns-Hamuro *et al.*, 2005, Protein Sci 14: 2982-92; Carr *et al.*, 2001, J Biol Chem 276: 17332-38; Alto *et al.*, 2003, Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50; Hundsrucker *et al.*, 2006, Biochem J 396:297-306; Stokka *et al.*, 2006, Biochem J 400:493-99; Gold *et al.*, 2006, Mol Cell 24: 383-95; Kinderman *et al.*, 2006, Mol Cell 24:397-408).

Por ejemplo, Kinderman *et al.* (2006, Mol Cell 24: 397-408) examinaron la estructura cristalina de la interacción de unión de AD-DDD y llegaron a la conclusión de que la secuencia de DDD humana contenía diversos restos de aminoácidos conservados que eran importantes en la formación de dímeros o en la unión de AKAP, subrayados en la SEQ ID NO: 1 mostrada a continuación. (Véase la Figura 1 de Kinderman *et al.*, 2006.) El experto en la técnica se percata de que al diseñar variantes de secuencia de la secuencia de DDD, sería deseable evitar la modificación de cualquiera de los restos subrayados, aunque podrían realizarse sustituciones conservativas de aminoácidos para los restos que son menos críticos para la dimerización y la unión de AKAP.

SHIQIPPGLTELLQGTYVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

Como se indica con más detalle a continuación, se han caracterizado sustituciones conservativas de aminoácidos para cada uno de los veinte L-aminoácidos comunes. Por tanto, basándose en los datos de Kinderman (2006) y en las sustituciones conservativas de aminoácidos, en la **Tabla 2** se muestran las posibles secuencias alternativas de DDD basadas en la SEQ ID NO:1. En la elaboración de la **Tabla 2**, sólo se tuvieron en cuenta las sustituciones de aminoácidos sumamente conservativas. Por ejemplo, los restos con carga solo se sustituyeron por residuos de la misma carga, los restos con cadenas laterales pequeñas se sustituyeron por restos de tamaño similar, las cadenas laterales de hidroxilo solo se sustituyeron por otros hidroxilos, etc. Debido al efecto único de la prolina sobre la estructura secundaria de los aminoácidos, ningún otro resto se sustituyó por prolina. En la SEC ID NO: 12 a la SEC ID NO: 31 indicadas a continuación, se muestra un número limitado de dichas posibles secuencias alternativas de fracciones de DDD. El experto en la técnica se percata de que a través de técnicas estándar se puede construir una gran cantidad de especies alternativas dentro del género de fracciones de DDD, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos comercial o técnicas de mutagénesis bien conocidas. El efecto de las sustituciones de aminoácidos sobre la unión de la fracción de AD también puede determinarse fácilmente mediante ensayos de unión estándar, por ejemplo, como los descritos en Alto *et al.* (2003, Proc Natl Acad Sci USA 100: 4445-50).

**Tabla 2. Sustituciones conservativas de aminoácidos en DDD1 (SEQ ID NO: 1). Secuencia consenso descrita como SEQ ID NO: 87.**

S	H	I	Q	I	P	P	G	L	T	E	L	L	Q	G	Y	T	V	E	V	L	R
T	K		N				A		S	D			N	A		S		D			K
	R																				

Q	Q	P	P	D	L	V	E	F	A	V	E	Y	F	T	R	L	R	E	A	R	A
N	N			E			D		L		D			S	K		K	D	L	K	L
									I										I		I
									V										V		V

THIQIPPGLTELLQGTYVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 12)

SKIQIPPGLTELLQGTYVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 13)

SRIQIPPGLTELLQGTYVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 14)

SHINIPPGLTELLQGTYVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:15)

SHIQIPPALTELLQGTYVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:16)

SHIQIPPGLSELLQGTYVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:17)

SHIQIPPGLTDLLQGTYVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:18)

SHIQIPPGLTELLNGTYVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:19)

SHIQIPPGLTELLQAYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:20)

SHIQIPPGLTELLQGYSTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:21)

SHIQIPPGLTELLQGYTVDVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:22)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLKQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:23)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRNQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:24)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQNPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:25)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPELVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:26)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:27)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFLVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:28)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFIVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:29)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFVVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:30)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVDYFTRLREARA (SEQ ID NO:31)

5 Alto *et al.* (2003, Proc Natl Acad Sci USA 100: 4445-50) realizaron un análisis bioinformático de la secuencia de AD de varias proteínas AKAP para diseñar una secuencia de AD selectiva de RII denominada AKAP-IS (SEQ ID NO: 3), con una constante de unión para DDD de 0,4 nM. La secuencia AKAP-IS se diseñó como un antagonista peptídico de la unión de AKAP con PKA. Los restos en la secuencia AKAP-IS en los que las sustituciones tendían a disminuir la unión con DDD se subrayan en la SEQ ID NO: 3 mostrada a continuación. El experto en la técnica se percatará de que al diseñar variantes de secuencia de la secuencia de AD, sería deseable evitar la modificación de cualquiera de los restos subrayados, aunque podrían realizarse sustituciones conservativas de aminoácidos para los restos que son menos críticos para la unión de DDD. En la **Tabla 3** se muestran posibles sustituciones conservativas de aminoácidos en la secuencia de AKAP-IS (AD1, SEQ ID NO: 3), similares a las mostradas para DDD1 (SEQ ID NO: 1) en **Tabla 2** anterior.

15 En la SEC ID NO: 32 a la SEC ID NO: 49 indicadas a continuación, se muestra un número limitado de dichas posibles secuencias alternativas de fracciones de AD. Nuevamente, basándose en los datos de Alto *et al.* (2003), el experto en la técnica podría fabricar, analizar y utilizar una gran cantidad de especies dentro del género de posibles secuencias de fracciones de AD. Se observa que la Figura 2 de Alto (2003) muestra un número aún mayor de posibles sustituciones de aminoácidos que se pueden realizar, conservando al mismo tiempo la actividad de unión en las fracciones de DDD, basándose en experimentos de unión reales.

20 *AKAP-IS*

QIEYLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:3)

**Tabla 3. Sustituciones conservativas de aminoácidos en AD1 (SEQ ID NO: 3). Secuencia de consenso descrita como SEQ ID NO: 88.**

Q	I	E	Y	L	A	K	Q	I	V	D	N	A	I	Q	Q	A
N	LV	D	FTS	IV		R	N			E	Q			N	N	LIV

25 NIEYLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:32)

QLEYLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:33)

QVEYLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:34)

QIDYLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:35)

QIEFLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:36)

30 QIETLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:37)

QIESLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:38)

QIEYIAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:39)

QIEYVAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:40)

QIEYLARQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:41)

35 QIEYLAKNIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO:42)

QIEYLAKQIVEN**NAIQQA** (SEQ ID NO:43)

QIEYLAKQIVDQ**AIQQA** (SEQ ID NO:44)

QIEYLAKQIVDN**AINQA** (SEQ ID NO:45)

QIEYLAKQIVDN**AIQNA** (SEQ ID NO:46)

40 QIEYLAKQIVD**NAIQQL** (SEQ ID NO:47)

QIEYLAKQIVD**NAIQQI** (SEQ ID NO:48)

QIEYLAKQIVD**NAIQQV** (SEQ ID NO:49)

45 Gold *et al.* (2006, Mol Cell 24: 383-95) utilizaron cristalografía y exploración de péptidos para desarrollar una secuencia SuperAKAP-IS (SEQ ID NO: 50), que presenta una selectividad cinco órdenes de magnitud superior para la isoforma RII de PKA en comparación con la isoforma RI. Los restos subrayados indican las posiciones de las sustituciones de

aminoácidos, en relación con la secuencia AKAP-IS, que aumentaron la unión con la fracción de DDD de RII $\alpha$ . En esta secuencia, el resto Q N-terminal se numera como resto número 4 y el resto A C-terminal es el resto número 20. Los restos en los que se pudieron realizar sustituciones para afectar a la afinidad por RII $\alpha$  fueron los restos 8, 11, 15, 16, 18, 19 y 20 (Gold *et al.*, 2006). Se contempla que en algunas realizaciones alternativas, para preparar construcciones DNL<sup>TM</sup>, la secuencia de SuperAKAP-IS pueda sustituirse por la secuencia de la fracción de AD de AKAP-IS. En las SEQ ID NO: 51-53 se muestran otras secuencias alternativas que podrían sustituirse por la secuencia de AD de AKAP-IS. Las sustituciones relativas a la secuencia de AKAP-IS están subrayadas. Se espera que, al igual que la secuencia de AD2 mostrada en la SEQ ID NO: 4, la fracción de AD también pueda incluir los restos N-terminales de cisteína y glicina y los restos C-terminales de glicina y cisteína adicionales.

10 *SuperAKAP-IS*

QIEYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID NO:50)

*Secuencias de AKAP alternativas*

QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:51)

QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:52)

15 QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:53)

En la figura 2 de Gold *et al.* se describen secuencias adicionales de unión a DDD de una variedad de proteínas AKAP, que se muestran a continuación.

AKAP específicas de RII

*AKAP-KL*

20 PLEYQAGLLVQNAIQQAI (SEQ ID NO:54)

*AKAP79*

LLIETASSLVKNAIQLSI (SEQ ID NO:55)

*AKAP-Lbc*

LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID NO:56)

25 AKAP específicas de RI

*AKAP<sub>ce</sub>*

ALYQFADRFSELVISEAL (SEQ ID NO:57)

*RIAD*

LEQVANQLADQIIKEAT (SEQ ID NO:58)

30 *PV38*

FEELAWKIAKMIWSDVF (SEQ ID NO:59)

AKAP de doble especificidad

*AKAP7*

ELVRLSKRLVENAVLKAV (SEQ ID NO:60)

35 *MAP2D*

TAEVVSARIVQVVTAQAV (SEQ ID NO:61)

*DAKAP1*

QIKQAAFQLISQVILEAT (SEQ ID NO:62)

*DAKAP2*

40 LAWKIAKMIWSDVMQQ (SEQ ID NO:63)

Stokka *et al.* (2006, Biochem J 400: 493-99) también desarrollaron péptidos competidores de la unión de AKAP con PKA, mostrados en las SEQ ID NO: 64-66. Los antagonistas peptídicos se designaron como Ht31 (SEQ ID NO:64), RIAD (SEQ ID NO:65) y PV-38 (SEQ ID NO:66). El péptido Ht-31 mostró una mayor afinidad por la isoforma RII de la PKA, mientras que RIAD y PV-38 mostraron mayor afinidad por RI.

Ht31

DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO:64)

RIAD

LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO:65)

5 PV-38

FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO:66)

10 Hundsrucker *et al.* (2006, Biochem J 396: 297-306) desarrollaron incluso otros péptidos competidores de la unión de la proteína AKAP con la PKA, con una constante de unión tan baja como de 0,4 nM para el DDD de la forma RII de la PKA. En la Tabla 1 de Hundsrucker *et al.*, se proporcionan las secuencias de varios péptidos antagonistas de AKAP, reproducidas en la Tabla 4 a continuación. AKAPIS representa un péptido sintético que se une a la subunidad RII. Los restantes péptidos proceden de los dominios de unión a RII de las AKAP indicadas.

**Tabla 4. Secuencias peptídicas de AKAP**

	Secuencia peptídica
AKAPIS	QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)
AKAPIS-P	QIEYLAKQIPDNAIQQA (SEQ ID NO:67)
Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (SEQ ID NO:68)
Ht31-P	KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAG (SEQ ID NO:69)
AKAP7δ-wt-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:70)
AKAP7δ-L304T-pep	PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:71)
AKAP7δ-L308D-pep	PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:72)
AKAP7δ-P-pep	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:73)
AKAP7δ-PP-pep	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:74)
AKAP7δ-L314E-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY (SEQ ID NO:75)
AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA (SEQ ID NO: 76)
AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ (SEQ ID NO:77)
AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL (SEQ ID NO:78)
AKAP9-pep	LEKQYQEQLSEEVAKVIVSMSIAFA (SEQ ID NO:79)
AKAP10-pep	NTDEAQEELAWKIAKMIVSDIMQQA (SEQ ID NO:80)
AKAP11-pep	VNLDKKAVLAEKIVAEAEKAEREL (SEQ ID NO:81)
AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNIQTAVDQF (SEQ ID NO:82)
AKAP14-pep	TQDKNYEDELTAVALALVEDVINYA (SEQ ID NO:83)
Rab32-pep	ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH (SEQ ID NO:84)

15 Los restos que estaban sumamente conservados entre los dominios AD de diferentes proteínas AKAP se indican a continuación subrayados con referencia a la secuencia AKAP IS (SEQ ID NO: 3). Los restos son los mismos que los observados por Alto *et al.* (2003), con la adición del resto de alanina C-terminal. (Véase la FIG.4 de Hundsrucker *et al.* (2006), que se incorpora en la presente memoria por referencia). Las secuencias de antagonistas peptídicos con afinidades particularmente altas por la secuencia de DDD de RII fueron las de AKAP-IS, AKAP7δ-wt-pep, AKAP7δ-L304T-pep y AKAP7δ-L308D-pep.

20 *AKAP-IS*

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

25 Carr *et al.* (2001, J Biol Chem 276: 17332-38) examinaron el grado de homología de las secuencias entre diferentes secuencias de DDD de unión a AKAP de proteínas humanas y no humanas e identificaron restos en las secuencias de DDD que parecían ser los más sumamente conservados entre las diferentes fracciones de DDD. Estos se indican a continuación subrayados con referencia a la secuencia de DDD de RIIα de la PKA humana de SEQ ID NO: 1. Los restos que se conservaron particularmente se indican además en cursiva. Los restos se superponen con los que sugieren Kinderman *et al.* (2006) que son importantes para la unión con las proteínas AKAP, pero no son idénticos a estos. El experto en la técnica se percatará de que al diseñar variantes de secuencia de DDD, sería más preferible evitar cambiar los restos más conservados (en cursiva), y también sería preferible evitar cambiar los restos conservados (subrayados), aunque pueden considerarse sustituciones conservativas de aminoácidos para los restos que no están subrayados ni en cursiva.

30 SHIQIPP GLTELLQGYTVEVLR QQPP DLVEFAVE YFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

En la Tabla 5 se muestra un conjunto modificado de sustituciones conservativas de aminoácidos para la secuencia de DDD1 (SEQ ID NO:1), basándose en los datos de Carr *et al.* (2001). El experto en la técnica podría obtener fácilmente secuencias de aminoácidos DDD alternativas como se ha descrito anteriormente en las Tablas 1 y 2.

**Tabla 5. Sustituciones conservativas de aminoácidos en DDD1 (SEQ ID NO: 1). Secuencia de consenso descrita como SEQ ID NO: 89.**

5

<u>S</u>	<u>H</u>	<u>I</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>R</u>
T			N						S								I L A				

<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>A</u>
N										I L A	D			s	K		K		L I V		L I V

El experto en la técnica se percatará de que para producir especies alternativas dentro del género de fracciones de AD o DDD, en las secuencias de aminoácidos de DDD o AD, pueden utilizarse estas y otras sustituciones de aminoácidos, utilizando técnicas que son estándar en el campo y solo experimentación habitual.

10

*Estructuras DNL™ alternativas*

En algunas realizaciones alternativas, pueden formarse construcciones DNL™ utilizando anticuerpos o fragmentos de anticuerpo construidos de manera alternativa, en los que puede unirse una fracción de AD en el extremo C-terminal de la cadena ligera kappa (C<sub>k</sub>), en lugar de en el extremo C-terminal del Fc de la cadena pesada. Las construcciones DNL™ formadas de manera alternativa se pueden preparar como se describe en las solicitudes de patente provisional de Estados Unidos con números de serie 61/654.310, presentada el 1 de junio de 2012, 61/662.086, presentada el 20 de junio de 2012, 61/673.553, presentada el 19 de julio de 2012 y 61/682.531, presentada el 13 de agosto de 2012. Las construcciones DNL™ conjugadas con cadena ligera muestran una actividad de la función efectora de Fc *in vitro* mejorada y farmacocinética, estabilidad y actividad antilinfoma *in vivo* mejoradas (Rossi *et al.*, 2013, Bioconjug Chem 24:63-71).

15

Las construcciones DNL™ conjugadas con C<sub>k</sub> pueden prepararse como se describe en las solicitudes de patente provisional de Estados Unidos con números de serie 61/654.310, 61/662.086, 61/673.553 y 61/682.531. En resumen, C<sub>k</sub>-AD2-IgG, se generó mediante ingeniería recombinante, por lo que el péptido AD2 se fusionó con el extremo C-terminal de la cadena ligera kappa. Dado que el extremo C natural de C<sub>k</sub> es un resto de cisteína, que forma un puente disulfuro con C<sub>H1</sub>, se utilizó un enlazador "bisagra" de 16 restos de aminoácido para separar el péptido AD2 del puente disulfuro C<sub>k</sub>-V<sub>H1</sub>. Los vectores de expresión de mamífero de C<sub>k</sub>-AD2-IgG-veltuzumab y C<sub>k</sub>-AD2-IgG-epratuzumab, se construyeron utilizando el vector pdHL2, que se utilizó anteriormente para la expresión de los módulos C<sub>H3</sub>-AD2-IgG homólogos. Se sintetizó una secuencia de nucleótidos de 2 208 pb que comprendía la secuencia del vector pdHL2 que va desde el sitio de restricción *Bam HI* dentro del intrón de V<sub>k</sub>/C<sub>k</sub> al sitio de restricción *Xho I* en la posición 3' del intrón de C<sub>k</sub>, con la inserción de la secuencia codificante del enlazador bisagra (EFPKPSTPPGSSGGAP, SEQ ID NO:162) y AD2, en fase en el extremo 3' de la secuencia codificante de C<sub>k</sub>. Esta secuencia sintética se insertó en los vectores de expresión IgG-pdHL2 para veltuzumab y epratuzumab a través de los sitios de restricción *Bam HI* y *Xho I*. La generación de clones de producción con SpESFX-10 se realizó como se describe para los módulos C<sub>H3</sub>-AD2-IgG. C<sub>k</sub>-AD2-IgG-veltuzumab y C<sub>k</sub>-AD2-IgG-epratuzumab se produjeron mediante clones de producción transfectados de manera estable en cultivo en frasco rotatorio por lotes, y se purificaron del líquido sobrenadante en una sola etapa utilizando cromatografía de afinidad de proteína A MabSelect (GE Healthcare).

20

25

30

35

Siguiendo el mismo proceso de DNL™ descrito anteriormente para 22-(20)-(20) (Rossi *et al.*, 2009, Blood 113: 6161-71), C<sub>k</sub>-AD2-IgG-epratuzumab se conjugó con C<sub>H1</sub>-DDD2-Fab-veltuzumab, un módulo basado en Fab procedente de veltuzumab, para generar bsHexAb 22\*-(20)-(20), donde 22\* indica el módulo C<sub>k</sub>-AD2 de epratuzumab y cada (20) simboliza un dímero estabilizado de Fab de veltuzumab. Las propiedades de 22\*-(20)-(20) se compararon con las de 22-(20)-(20), el Fc-bsHexAb homólogo que comprende C<sub>H3</sub>-AD2-IgG-epratuzumab, que tiene una composición y un tamaño molecular similares, pero una arquitectura diferente.

40

Siguiendo el mismo proceso de DNL™ descrito anteriormente para 20-2b (Rossi *et al.*, 2009, Blood 114: 3864-71), C<sub>k</sub>-AD2-IgG-veltuzumab, se conjugó con IFNα2b-DDD2, un módulo de IFNα2b con un péptido DDD2 fusionado en su extremo C-terminal, para generar 20\*-2b, que comprende veltuzumab con un IFNα2b dimérico fusionado a cada cadena ligera. Las propiedades de 20\*-2b se compararon con las de 20-2b, que es el Fc-IgG-IFNα homólogo.

45

Cada uno de los bsHexAb e IgG-IFNα se aisló de la mezcla de reacción de DNL™ mediante cromatografía de afinidad MabSelect. Los dos prototipos procedentes de C<sub>k</sub>, un anticuerpo hexavalente biespecífico anti-CD22/CD20, que comprende epratuzumab (anti-CD22) y cuatro Fab de veltuzumab (anti-CD20), y una inmunocitocina dirigida a CD20,

que comprende veltuzumab y cuatro moléculas de interferón- $\alpha$ 2b, muestran funciones efectoras de Fc *in vitro* mejoradas, así como farmacocinética, estabilidad y actividad antilinfoma *in vivo* mejoradas, en comparación con sus homólogos procedentes de Fc.

### Sustituciones de aminoácidos

5 En ejemplos alternativos, los métodos y composiciones descritos pueden implicar la producción y el uso de proteínas o péptidos con uno o más restos de aminoácidos sustituidos. Por ejemplo, las secuencias de DDD y/o AD utilizadas para fabricar construcciones DNL™ pueden modificarse como se ha indicado anteriormente.

10 El experto en la técnica sabrá que, en general, las sustituciones de aminoácidos normalmente implican la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de propiedades relativamente similares (es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos). 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 amplios estudios y conocimientos en la técnica.

15 Por ejemplo, puede tenerse en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos (Kyte & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157:105-132). El carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte & Doolittle, 1982), estas 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). Cuando se hacen sustituciones conservativas, se prefiere el uso de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén en  $\pm 2$ , prefiriéndose más los que estén en  $\pm 1$  e incluso prefiriéndose aún más los que estén en  $\pm 0,5$ .

20 La sustitución de aminoácidos también puede tener en cuenta la hidrofiliidad del resto de aminoácido (p. ej., patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 4.554.101). Se han asignado valores de hidrofiliidad a los restos 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.

25 Otras consideraciones incluyen el tamaño de la cadena lateral de aminoácidos. Por ejemplo, generalmente no sería preferible reemplazar un aminoácido por una cadena lateral compacta, tal como glicina o serina, por un aminoácido con una cadena lateral voluminosa, p. ej., triptófano o tirosina. También se tiene en cuenta el efecto de varios restos de aminoácidos sobre la estructura secundaria de la proteína. A través de estudios empíricos, se ha determinado el efecto de diferentes restos de aminoácidos sobre la tendencia de los dominios de las proteínas a adoptar una estructura secundaria de hélice alfa, lámina beta o giro inverso y se conoce en la técnica (véase, p. ej., Chou & Fasman, 1974, Biochemistry, 13:222-245; 1978, Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276; 1979, Biophys. J., 26:367-384).

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

35 Otras consideraciones para las sustituciones de aminoácidos incluyen si el resto se encuentra o no en el interior de una proteína o si está expuesto a un disolvente. Para restos interiores, las sustituciones conservativas 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, p. ej., el sitio web de PROWL en rockefeller.edu) Para restos expuestos a disolventes, las sustituciones conservativas 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.) Para ayudar en la selección de sustituciones de aminoácidos, se han construido diversas matrices, tales como la matriz de puntuación PAM250, matriz de Dayhoff, matriz de Grantham, matriz de McLachlan, matriz de Doolittle, matriz de Henikoff, matriz de Miyata, matriz de Fitch, matriz de Jones, matriz de Rao, matriz de Levin y matriz de Risler (*idem*).

40 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 restos cargados positivamente (p. ej., His, Arg, Lys) y restos cargados negativamente (p. ej., Asp, Glu) o enlaces disulfuro entre restos de cisteína cercanos.

45 Los métodos de sustitución de cualquier aminoácido por cualquier otro aminoácido en una secuencia de proteínas codificada, son bien conocidos para el experto en la técnica y objeto de experimentación habitual, por ejemplo, mediante la técnica de mutagénesis dirigida o mediante la síntesis y el ensamblaje de oligonucleótidos que codifican una sustitución de aminoácidos y corte y empalme en una construcción de vector de expresión.

### Presentación en fagos

Algunos ejemplos de las composiciones y/o métodos descritos, pueden referirse a péptidos de unión y/o a peptidomiméticos de diversas moléculas, células o tejidos diana. Los péptidos de unión pueden identificarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, la técnica de presentación en fagos. En el campo técnico se conocen bien diversos métodos de presentación en fagos y técnicas para producir diversas poblaciones de péptidos. Por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 5.223.409; 5.622.699 y 6.068.829 se describen métodos para preparar una fagoteca. La técnica de presentación en fagos implica la manipulación genética de bacteriófagos para que pequeños péptidos puedan expresarse en su superficie (Smith y Scott, 1985, Science 228:1315-1317; Smith y Scott, 1993, Meth. Enzymol. 21:228-257). Además de péptidos, dominios proteicos más grandes, tales como anticuerpos monocatenarios, también pueden presentarse en la superficie de las partículas de fagos (Arap *et al.*, 1998, Science 279:377-380).

El direccionamiento de secuencias de aminoácidos selectivas para un tipo de órgano, tejido, célula o molécula diana, puede aislarse a través de selección (Pasqualini y Ruoslahti, 1996, Nature 380:364-366; Pasqualini, 1999, The Quart. J. Nucl. Med. 43:159-162). Resumiendo, a un organismo o a tipos de órganos, tejidos y células aislados e intactos, se les administra una fagoteca que contiene los supuestos péptidos diana y se recogen muestras que contienen los fagos unidos. Los fagos que se unen a una diana pueden eluirse de un tipo de órgano, tejido, célula o molécula diana y después amplificarse haciendo que crezcan en bacterias hospedadoras.

El fago puede propagarse en bacterias hospedadoras entre rondas de selección. En lugar de ser lisada por el fago, la bacteria puede secretar múltiples copias de fago que presenten un inserto particular. Si se desea, el fago amplificado puede exponerse nuevamente a los tipos de órganos, tejidos, células o molécula diana y recogerse para efectuar rondas de selección adicionales. Se pueden realizar múltiples rondas de selección hasta que se obtenga una población de agentes de unión selectivos o específicos. La secuencia de aminoácidos de los péptidos se puede determinar secuenciando el ADN correspondiente al inserto del péptido de direccionamiento en el genoma del fago. Después, el péptido de direccionamiento identificado se puede producir como un péptido sintético mediante técnicas de química de proteínas estándar (Arap *et al.*, 1998, Smith *et al.*, 1985).

Se puede utilizar un protocolo de sustracción para reducir adicionalmente a unión de fagos de fondo. El propósito de la sustracción es retirar los fagos de la fagoteca que se unen a dianas distintas de la diana de interés. De manera alternativa, la fagoteca puede preseleccionarse frente a una célula, tejido u órgano de control. Por ejemplo, después de explorar previamente una fagoteca frente a una línea celular normal de control, pueden identificarse péptidos de unión a tumores. Después de la sustracción, la fagoteca puede explorarse frente a la molécula, célula, tejido u órgano de interés. Se conocen y pueden utilizarse otros métodos de protocolos de sustracción, por ejemplo, como los descritos en las patentes de Estados Unidos N.º 5.840.841, 5.705.610, 5.670.312 y 5.492.807.

### Nanocuerpos

Los nanocuerpos son anticuerpos de un solo dominio con un tamaño de aproximadamente 12-15 kDa (aproximadamente una longitud de 110 aminoácidos). Los nanocuerpos pueden unirse selectivamente a antígenos diana, como anticuerpos de tamaño completo y tienen afinidades similares por los antígenos. Sin embargo, como su tamaño es mucho más pequeño, pueden introducirse mejor en los tumores sólidos. El tamaño más pequeño también contribuye dar estabilidad al nanocuerpo, que es más resistente al pH y a las temperaturas extremas de lo que lo son los anticuerpos de tamaño completo (Van Der Linden *et al.*, 1999, Biochim Biophys Act 1431:37-46). Los anticuerpos de un solo dominio se desarrollaron originalmente después de descubrir que los camélidos (camellos, alpacas, llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales sin cadenas ligeras (p. ej., Hamsen *et al.*, 2007, Appl Microbiol Biotechnol 77:13-22). Los anticuerpos de cadena pesada constan de un solo dominio variable ( $V_{HH}$ ) y de dos dominios constantes ( $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ). Al igual que los anticuerpos, los nanocuerpos pueden desarrollarse y utilizarse como construcciones multivalentes y/o biespecíficas. En el comercio se están desarrollando formas humanizadas de nanocuerpos que se dirigen a una variedad de antígenos diana, tales como IL-6R, vWF, TNF, RSV, RANKL, IL-17A y F e IgE (p. ej., ABLYNX®, Gante, Bélgica), con posible uso clínico en cáncer, inflamación, enfermedad infecciosa, enfermedad de Alzheimer, síndrome coronario agudo y otros trastornos (p. ej., Saerens *et al.*, 2008, Curr Opin Pharmacol 8:600-8; Muyldermans, 2013, Ann Rev Biochem 82:775-97; Ibanez *et al.*, 2011, J Infect Dis 203:1063-72).

La semivida en plasma de los nanocuerpos es más corta que la de los anticuerpos de tamaño completo, con eliminación principalmente por vía renal. Debido a que carecen de una región Fc, no presentan citotoxicidad dependiente del complemento.

Los nanocuerpos pueden producirse mediante inmunización de camellos, llamas, alpacas o tiburones con antígenos diana, seguido de aislamiento de ARNm, clonación en bibliotecas y exploración para determinar la unión con el antígeno. Las secuencias de los nanocuerpos pueden humanizarse mediante técnicas estándar (p. ej., Jones *et al.*, 1986, Nature 321: 522, Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323, Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239: 1534, Carter *et al.*, 1992, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 4285, Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech. 12: 437, Singer *et al.*, 1993, J. Immun. 150: 2844). La humanización es relativamente sencilla debido a la alta homología entre las secuencias FR de camélidos y seres humanos.

En varias realizaciones de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, los conjugados CL2A-SN-38 en cuestión pueden comprender nanocuerpos para el suministro dirigido del fármaco conjugado a células, tejidos, órganos o patógenos. Se describen nanocuerpos de utilidad, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 7.807.162; 7.939.277; 8.188.223; 8.217.140; 8.372.398; 8.557.965; 8.623.361 y 8.629.244.

## 5 Protocolos de conjugación

El protocolo de conjugación preferido se basa en una reacción entre un tiol y una maleimida, un tiol y una vinilsulfona, un tiol y una bromoacetamida o un tiol y una yodoacetamida que se realiza fácilmente a pH neutro o ácido. Esto evita la necesidad de condiciones de pH más altas para conjugaciones tales como, por ejemplo, las que se necesitarían al utilizar ésteres activos. Más adelante, en el apartado de Ejemplos, se describen detalles adicionales de ejemplos de protocolos de conjugación.

## Tratamiento Terapéutico

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método de tratamiento de un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado terapéutico como se describe en la presente memoria. Las enfermedades que pueden tratarse con los conjugados terapéuticos descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, neoplasias malignas de células B (p. ej., linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, tricoleucemia) utilizando, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD22 tal como el MAb hLL2 (epratuzumab, véase la patente de Estados Unidos N.º 6.183.744), contra otro epítipo CD22 (hRFB4) o anticuerpos contra otros antígenos de células B, tales como CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD37, CD40, CD40L, CD52, CD74, CD80 o HLA-DR. Otras enfermedades incluyen, pero sin limitación, adenocarcinomas de epitelios del sistema digestivo de origen endodérmico, cánceres tales como cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico y otros carcinomas, sarcomas, tumores gliales, leucemias mieloides, etc. En particular, de manera ventajosa, se utilizan anticuerpos contra un antígeno, p. ej., un antígeno oncofetal, producidos por, o asociados a, un tumor sólido maligno o una neoplasia hematopoyética, p. ej., un tumor gastrointestinal, de estómago, de colon, de esófago, de hígado, de pulmón, de mama, de páncreas, de hígado, de próstata, de ovario, de testículo, de cerebro, de hueso o linfático, un sarcoma o un melanoma. Dichas terapias pueden suministrarse una o varias veces, dependiendo de la patología y de la tolerabilidad del conjugado, y también pueden utilizarse opcionalmente en combinación con otras modalidades terapéuticas, tales como cirugía, radiación externa, radioinmunoterapia, inmunoterapia, quimioterapia, terapia antisentido, terapia con ARN de interferencia, terapia génica y similares. Cada combinación se adaptará al tipo de tumor, al estadio, a la afección del paciente y a la terapia anterior, así como a otros factores considerados por el médico tratante.

Como se emplea en esta memoria, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (es decir, vertebrados e invertebrados) incluyendo, pero sin limitación, mamíferos, incluyendo seres humanos. No se pretende que el término se limite a una edad o sexo en particular. Por tanto, en el término, se incluyen sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, de género masculino o femenino. Las dosis indicadas en la presente memoria son para seres humanos, pero pueden ajustarse al tamaño de otros mamíferos, así como a niños, según el peso o el tamaño por metro cuadrado.

En un ejemplo preferido, pueden utilizarse conjugados terapéuticos que comprenden un anticuerpo anti-EGP-1 (anti-TROP-2), tal como el MAb hRS7, para tratar carcinomas tales como carcinomas de esófago, páncreas, pulmón, estómago, colon y recto, vejiga urinaria, mama, ovario, útero, riñón y próstata, como se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 7.238.785, 7.517.964 y 8.084.583. Un anticuerpo contra hRS7 es un anticuerpo humanizado que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO: 90); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:91); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:92) y secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:93); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:94) y CDR3 (GGFGSSYWFYFDV, SEQ ID NO:95)

En otro ejemplo, pueden utilizarse conjugados terapéuticos que comprenden un anticuerpo anti-CEACAM5 (p. ej., hMN-14, labretuzumab) y/o un anticuerpo anti-CEACAM6 (p. ej., hMN-3 o hMN-15) para tratar cualquiera de una variedad de cánceres que expresan CEACAM5 y/o CEACAM6, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N.º 7.541.440; 7.951.369; 5.874.540; 6.676.924 y 8.267.865. Los tumores sólidos que pueden tratarse utilizando anti-CEACAM5, anti-CEACAM6, o una combinación de ambos, incluyen, pero sin limitación, cánceres de mama, pulmón, páncreas, esófago, tiroides, médula, ovario, colon, recto, vejiga urinaria, boca y estómago. Una mayoría de los carcinomas, incluidos los cánceres gastrointestinales, respiratorios, genitourinarios y de mama, expresan CEACAM5 y pueden tratarse con los inmunoconjugados en cuestión. Un anticuerpo hMN-14 es un anticuerpo humanizado que comprende secuencias CDR de la región variable de cadena ligera CDR1 (KASQDVGTSVA; SEQ ID NO:96), CDR2 (WTSTRHT; SEQ ID NO:97) y CDR3 (QQYSLYRS; SEQ ID NO: 98), y secuencias de CDR de la región variable de cadena pesada CDR1 (TYWMS; SEQ ID NO:99), CDR2 (EIHPDSSTINYAPSLKD; SEQ ID NO:100) y CDR3 (LYFGFPWFAY; SEQ ID NO:101).

Un anticuerpo hMN-3 es un anticuerpo humanizado que comprende secuencias CDR de la región variable de cadena ligera CDR1 (RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO:102), CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO:103) y CDR3 (FQGSHPPT, SEQ ID NO:104) y secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:105), CDR2

(WINTYTGEPTYADDFKG, SEQ ID NO:106) y CDR3 (KGWMDFNSSLDY, SEQ ID NO:107).

Un anticuerpo de hMN-15 es un anticuerpo humanizado que comprende secuencias de CDR de la región variable de cadena ligera SASSRVSYIH (SEQ ID NO:108); GTSTLAS (SEQ ID NO:109); y QQWSYNPPT (SEQ ID NO:110); y secuencias de CDR de la región variable de cadena pesada DYYMS (SEQ ID NO:111); FIANKANGHTTDYSPSVKG (SEQ ID NO:112); y DMGIRWNFDV (SEQ ID NO:113).

Preferiblemente, pueden utilizarse conjugados terapéuticos que comprenden un anticuerpo anti-CD74 (p. ej., hLL1, milatuzumab, descrito en las patentes de Estados Unidos N.º 7.074.403; 7.312.318; 7.772.373; 7.919.087 y 7.931.903) para tratar cualquiera de una variedad de cánceres que expresan CD74, incluyendo, pero sin limitación, cáncer renal, de pulmón, intestino, estómago, mama, próstata u ovario, así como varios cánceres hematológicos, tales como mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. Un anticuerpo hLL1 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de CDR de cadena ligera CDR1 (RSSQLVHRNGNTYLH; SEQ ID NO:114), CDR2 (TVSNRFS; SEQ ID NO:115) y CDR3 (SQSSHVPPT; SEQ ID NO:116) y las secuencias de CDR de la región variable de cadena pesada CDR1 (NYGVN; SEQ ID NO:117), CDR2 (WINPNTGEPTFDDDFKG; SEQ ID NO:118) y CDR3 (SRGKNEAWFAY; SEQ ID NO:119).

En otro ejemplo, conjugados terapéuticos que comprenden un anticuerpo anti-CD22 (p. ej., hLL2, epratuzumab, descrito en las patentes de Estados Unidos N.º 5.789.554; 6.183.744; 6.187.287; 6.306.393; 7.074.403 y 7.641.901, o el anticuerpo RFB4 quimérico o humanizado), pueden utilizarse para tratar cualquiera de una variedad de cánceres que expresan CD22, incluyendo, pero sin limitación, formas indolentes de linfomas de células B, formas agresivas de linfomas de células B, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias linfocíticas agudas, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma folicular o linfoma difuso de células B. Los conjugados anti-CD22 también son útiles para tratar enfermedades autoinmunitarias, tales como trombocitopenia inmunitaria aguda, trombocitopenia inmunitaria crónica, dermatomiositis, corea de Sydenham, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, diabetes mellitus (p. ej., diabetes juvenil), púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nodular, arteritis de Takayasu, vasculitis asociadas a ANCA, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía por IgA, panarteritis nodular, espondilitis anquilosante, síndrome de Good-pasture, tromboangitis obliterante, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis activa crónica, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis, alveolitis fibrosante, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), rechazo de trasplante de órganos, síndrome séptico, septicemia e inflamación. Un anticuerpo hLL2 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de CDR de cadena ligera CDR1 (KSSQSVLYSANHKYLA, SEQ ID NO: 120), CDR2 (WASTRES, SEQ ID NO: 121) y CDR3 (HQYLSSWTF, SEQ ID NO: 122) y las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (SYWLH, SEQ ID NO: 123), CDR2 (YINPRNDYTEYNQNFKD, SEQ ID NO: 124) y CDR3 (RDITTFY, SEQ ID NO: 125).

Preferiblemente, conjugados terapéuticos que comprenden anticuerpos anti-CSAp, tal como el MAb hMu-9, pueden utilizarse para tratar cáncer colorrectal, así como cánceres de páncreas y ovario como se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 6.962.702; 7.387.772; 7.414.121; 7.553.953; 7.641.891 y 7.670.804. Un anticuerpo hMu-9 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de CDR de cadena ligera CDR1 (RSSQSVHNSNGNTYLE, SEQ ID NO: 126), CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO: 127) y CDR3 (FQGSRVPYT, SEQ ID NO: 128) y las secuencias de CDR de la región variable de cadena pesada CDR1 (EYVIT, SEQ ID NO: 129), CDR2 (EIYPGSGSTSYNEKFK, SEQ ID NO: 130); y CDR3 (EDL, SEQ ID NO:131).

Los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb hPAM4 pueden utilizarse para tratar cáncer pancreático u otros tumores sólidos, como se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 7.238.786 y 7.282.567. Un anticuerpo hPAM4 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de CDR de la región variable de cadena ligera CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO: 132); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:133); y CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:134); y secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:135); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:136) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:137).

En otro ejemplo, conjugados terapéuticos que comprenden un MAb anti-AFP, tal como IMM31, puede utilizarse 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 Estados Unidos N.º 7.300.655. Un anticuerpo IMM31 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (SYVIH, SEQ ID NO:138), CDR2 (YIHPYNGGTYNEKFKG, SEQ ID NO:139) y CDR3 (SGGGDPFAY, SEQ ID NO:140) y de cadena ligera CDR1 (KASQDINKYIG, SEQ ID NO:141), CDR2 (YTSALLP, SEQ ID NO:142) y CDR3 (LQYDDLWT, SEQ ID NO:143).

En otro ejemplo, conjugados terapéuticos que comprenden un MAb anti-HLA-DR, tal como hL243, pueden utilizarse para tratar linfoma, leucemia, cánceres de piel, esófago, estómago, colon, recto, páncreas, pulmón, mama, ovario, vejiga, endometrio, cuello uterino, testículo, riñón, hígado, melanoma u otros tumores productores de HLA-DR, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 7.612.180. Un anticuerpo hL243 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:144), CDR2

(WINTYTREPTYADDFKG, SEQ ID NO: 145) y CDR3 (DITAVVPTGFDY, SEQ ID NO: 146) y secuencias de CDR de cadena ligera CDR1 (RASENIYSNLA, SEQ ID NO:147), CDR2 (AASNLA, SEQ ID NO:148) y CDR3 (QHFWTTPWA, SEQ ID NO:149).

5 En otro ejemplo, conjugados terapéuticos que comprenden un MAb anti-CD20, tales como veltuzumab (hA20), 1F5, obinutuzumab (GA101) o rituximab, pueden utilizarse para tratar linfoma, leucemia, púrpura trombocitopénica inmunitaria, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, síndrome de Evans, artritis, arteritis, pénfigo vulgar, rechazo de injerto renal, rechazo de injerto cardíaco, artritis reumatoide, linfoma de Burkitt, linfoma no Hodgkin, linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño, linfoma difuso de células B, linfoma de la zona marginal, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, diabetes mellitus de tipo I, GVHD, esclerosis múltiple o mieloma múltiple, como se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 7.435.803 u 8.287.864. Un anticuerpo hA20 (veltuzumab) es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de CDR de cadena ligera CDRL1 (RASSSVSYIH, SEQ ID NO:150), CDRL2 (ATSNLAS, SEQ ID NO:151) y CDRL3 (QQWTSNPPT, SEQ ID NO:152) y secuencias de CDR de cadena pesada CDRH1 (SYNMH, SEQ ID NO:153), CDRH2 (AIYPGNGDTSYNQKFKG, SEQ ID NO:154) y CDRH3 (STYYGGDWYFDV, SEQ ID NO:155).

15 En otro ejemplo, conjugados terapéuticos que comprenden un MAb anti-CD 19, tal como hA19, pueden utilizarse para tratar linfomas y leucemias relacionados con células B, tales como linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica o leucemia linfoblástica aguda. Otras patologías que pueden tratarse incluyen enfermedades autoinmunitarias, tales como trombocitopenia inmunitaria aguda o crónica, dermatomiositis, corea de Sydenham, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, pénfigoide ampolloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nodular, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía por IgA, panarteritis nodular, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangeítis obliterante, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis activa crónica, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis y alveolitis fibrosante, como se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 7.109.304, 7.462.352, 7.902.338, 8.147.831 y 8.337.840. Un anticuerpo hA19 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de CDR de cadena ligera CDR1 KASQSVYDGD SYLN (SEQ ID NO:156); CDR2 DASNLVS (SEQ ID NO: 157); y CDR3 QQSTEDPWT (SEQ ID NO:158) y las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 SYWMN (SEQ ID NO:159); CDR2 QIWPGDGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 160) y CDR3 RETTTVGRYYYYAMDY (SEQ ID NO: 161).

Los conjugados terapéuticos que comprenden anticuerpos anti-tenascina pueden utilizarse para tratar tumores hematopoyéticos y sólidos, y los conjugados que comprenden anticuerpos contra tenascina pueden utilizarse para tratar tumores sólidos, preferiblemente cánceres de cerebro como glioblastomas.

35 Preferiblemente, los anticuerpos que se utilizan en el tratamiento de enfermedades humanas son versiones de anticuerpos humanos o humanizados (injetados con CDR); aunque pueden utilizarse versiones murinas y quiméricas de anticuerpos. Para minimizar las respuestas inmunitarias se prefieren principalmente moléculas de IgG de la misma especie como agentes de suministro. Esto es particularmente importante al considerar la repetición de tratamientos. En seres humanos, es menos probable que un anticuerpo de IgG humano o humanizado genere una respuesta inmunitaria anti-IgG en los pacientes. Los anticuerpos, tales 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 pueden utilizarse para efectuar una terapia selectiva.

45 Los conjugados terapéuticos pueden utilizarse contra patógenos, ya que se conocen anticuerpos contra patógenos. Por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a marcadores producidos por lesiones infecciosas o asociados a ellas, incluyendo infecciones víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias, por ejemplo, causadas por patógenos tales como bacterias, rickettsias, micoplasma, protozoos, hongos y virus, y se han descrito antígenos y productos asociados a dichos microorganismos, entre otros, en Hansen *et al.*, en la patente de Estados Unidos N.º 3.927.193 y en las patentes de Estados Unidos de Goldenberg N.º 4.331.647.4.348.376, 4.361.544, 4.468.457, 4.444.744, 4.818.709 y 4.624.846 y en Reichert y Dewitz, anteriormente citados. En una realización preferida, los patógenos se seleccionan del grupo que consiste en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemofilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, virus de la rabia, virus de la gripe, citomegalovirus, virus del herpes simple I, virus del herpes simple II, virus parvovírico en suero humano, virus respiratorio sincicial, virus de la varicela zoster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del sarampión, adenovirus, virus de la leucemia humana de células T, virus de Epstein Barr, virus de la leucemia murina, virus de las paperas, virus de la estomatitis vesicular, virus sindbis, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus verrucoso, virus de la lengua azul, virus de Sendai, virus de la leucemia felina, reovirus, virus de la polio, virus de simio 40, virus del tumor mamario del ratón, virus del dengue, virus de la rubéola, virus del Nilo Occidental, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma*

*rhodesiensei*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Babesia bovis*, *Elmeria tenella*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania tropica*, *Trichinella spiralis*, *Theileria parva*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti*, *Mycoplasma artritidis*, *M. hyorhinae*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laylawii*, *M. salivarium* y *M. pneumoniae*, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.440.416.

Los conjugados farmacológicos preparados mediante los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, que comprenden anticuerpos anti-gp120 y otros anticuerpos anti-VIH de este tipo, pueden utilizarse como agentes terapéuticos para el VIH en pacientes con SIDA; y los conjugados farmacológicos de anticuerpos contra *Mycobacterium tuberculosis* son adecuados como agentes terapéuticos para la tuberculosis fármacorrefractiva. Se han examinado proteínas de fusión de MAb anti-gp120 (MAb anti VIH) y una toxina, tal como la exotoxina de *Pseudomonas*, en busca de propiedades antivíricas (Van Oigen *et al.*, J Drug Target, 5:75-91, 1998). Los intentos de tratar la infección por VIH en pacientes con SIDA fracasaron, posiblemente debido a una eficacia insuficiente o a una toxicidad inaceptable del hospedador. Los conjugados farmacológicos carecen ventajosamente de dichos efectos secundarios tóxicos de las toxinas proteicas y, por lo tanto, se utilizan ventajosamente en el tratamiento de la infección por VIH en pacientes con SIDA. Estos conjugados farmacológicos pueden administrarse solos o en combinación con otros antibióticos o agentes terapéuticos que son eficaces en dichos pacientes cuando se suministran solos. Como anticuerpos anti-VIH candidatos se incluyen el anticuerpo anti-envoltura P4/D10 descrito por Johansson *et al.* (AIDS. 3 de oct. de 2006; 20(15):1911-5), así como los anticuerpos anti-VIH descritos y comercializados por Polymun (Viena, Austria), que también se describen en la patente de Estados Unidos 5 831 034, patente de Estados Unidos 5 911 989 y Ucelar *et al.*, AIDS 2007; 21(16):2161-2170 y Joos *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50(5):1773-9. Un agente de direccionamiento preferido para el VIH son varias combinaciones de estos anticuerpos para superar la resistencia.

Se puede conseguir una incorporación más eficaz en células y patógenos utilizando anticuerpos monoespecíficos multivalentes, multiespecíficos o multivalentes. Ejemplos de dichos anticuerpos bivalentes y biespecíficos se encuentran en las patentes de Estados Unidos N.º 7.387.772; 7.300.655; 7.238.785; y 7,282,567. Estos anticuerpos multivalentes o multiespecíficos son particularmente preferidos en el direccionamiento de cánceres y organismos infecciosos (patógenos), que expresan múltiples dianas antigénicas e incluso múltiples epítomos de la misma diana antigénica, pero que a menudo eluden el direccionamiento de anticuerpos y la unión suficiente para la inmunoterapia debido a la expresión o disponibilidad insuficientes de una sola diana antigénica en la célula o patógeno. Al dirigirse a múltiples antígenos o epítomos, dichos anticuerpos muestran un mayor tiempo de unión y residencia en la diana, proporcionando así una mayor saturación con el fármaco que se dirige en esta invención.

Los conjugados terapéuticos también pueden utilizarse para tratar enfermedades autoinmunitarias o disfunción del sistema inmunitario (p. ej., enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de trasplante de órganos). Los anticuerpos de utilidad para tratar enfermedades autoinmunitarias/disfunciones inmunitarias, pueden unirse a antígenos ejemplares, que incluyen, pero sin limitación, BCL-1, BCL-2, BCL-6, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD34, CD38, CD40, CD40L, CD41a, CD43, CD45, CD55, CD56, CCD57, CD59, CD64, CD71, CD74, CD79a, CD79b, CD117, CD138, FMC-7, H2B, H3, H4, HLA-DR y FIM. Anticuerpos que se unen a estos y otros antígenos diana, comentados anteriormente, pueden utilizarse para tratar enfermedades autoinmunitarias o disfunciones inmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse con inmunoconjugados pueden incluir púrpura trombocitopénica idiopática aguda, púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, corea de Sydenham, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide ampolloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nodular, arteritis de Takayasu, vasculitis asociadas a ANCA, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía por IgA, panarteritis nodular, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, síndrome de Sjogren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis activa crónica, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis o alveolitis fibrosante.

El experto familiarizado con la técnica se percatará de que los inmunoconjugados en cuestión, que comprenden una camptotecina conjugada con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, pueden utilizarse solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos, tal como un segundo anticuerpo, segundo fragmento de anticuerpo, segundo inmunoconjugado, radionúclido, toxina, fármaco, agente quimioterapéutico, radioterapia, quimiocina, citocina, inmunomodulador, enzima, hormona, oligonucleótido, ARNi o ARNip. Dichos agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse por separado, en combinación con, o unidos a, los inmunoconjugados de anticuerpo-fármaco en cuestión.

Un agente terapéutico puede utilizarse en combinación con el conjugado de camptotecina preparado mediante los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, y puede comprender uno o más isótopos. Los isótopos radiactivos útiles para tratar tejidos enfermos incluyen, pero sin limitación, <sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>211</sup>At, <sup>62</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>90</sup>Y, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>47</sup>Sc, <sup>111</sup>Ag, <sup>67</sup>Ga, <sup>142</sup>Pr, <sup>153</sup>Sm, <sup>161</sup>Tb, <sup>166</sup>Dy, <sup>166</sup>Ho, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>189</sup>Re, <sup>212</sup>Pb, <sup>223</sup>Ra, <sup>225</sup>Ac, <sup>59</sup>Fe, <sup>75</sup>Se, <sup>77</sup>As, <sup>89</sup>Sr, <sup>99</sup>Mo, <sup>105</sup>Rh, <sup>109</sup>Pd, <sup>143</sup>Pr, <sup>149</sup>Pm, <sup>169</sup>Er, <sup>194</sup>Ir, <sup>198</sup>Au, <sup>199</sup>Au, <sup>227</sup>Th y <sup>211</sup>Pb. El radionúclido terapéutico

tiene preferiblemente una energía de desintegración comprendida 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 máxima de los núclidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente de 20 a 5 000 keV, más preferiblemente de 100-4 000 keV y lo más preferiblemente de 500-2 500 keV.

5 También se prefieren radionúclidos que se desintegren sustancialmente con partículas emisoras de 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 núclidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente <100 keV, más preferiblemente <70 keV. También se prefieren radionúclidos que se desintegren sustancialmente con la generación de partículas alfa. Dichos radionúclidos incluyen, pero sin limitación: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Th-227 y Fm-255. Las energías de desintegración de los radionúclidos emisores de partículas alfa útiles son preferiblemente de 2 000-10 000 keV, más preferiblemente de 3 000-8 000 keV y lo más preferiblemente de 4 000-7 000 keV. Otros posibles radioisótopos útiles incluyen <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>75</sup>Br, <sup>198</sup>Au, <sup>224</sup>Ac, <sup>126</sup>I, <sup>133</sup>I, <sup>77</sup>Br, <sup>113m</sup>In, <sup>95</sup>Ru, <sup>97</sup>Ru, <sup>103</sup>Ru, <sup>105</sup>Ru, <sup>107</sup>Hg, <sup>203</sup>Hg, <sup>121m</sup>Te, <sup>122m</sup>Te, <sup>125m</sup>Te, <sup>165</sup>Tm, <sup>167</sup>Tm, <sup>168</sup>Tm, <sup>197</sup>Pt, <sup>109</sup>Pd, <sup>105</sup>Rh, <sup>142</sup>Pr, <sup>143</sup>Pr, <sup>161</sup>Tb, <sup>166</sup>Ho, <sup>199</sup>Au, <sup>57</sup>Co, <sup>58</sup>Co, <sup>51</sup>Cr, <sup>59</sup>Fe, <sup>75</sup>Se, <sup>201</sup>Tl, <sup>225</sup>Ac, <sup>76</sup>Br, <sup>169</sup>Yb y similares.

Pueden suministrarse radionúclidos y otros metales, por ejemplo, utilizando grupos quelantes unidos a un anticuerpo o conjugado. Quelatos macrocíclicos tales como NOTA, DOTA y TETA, se utilizan con una variedad de metales y radiometales, más particularmente con radionúclidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Dichos complejos de quelato y metal pueden hacerse muy estables adaptando el tamaño del anillo al metal de interés. Para el complejo <sup>223</sup>Ra, pueden utilizarse otros quelatos de tipo anular, tales como poliéteres macrocíclicos.

Los agentes terapéuticos de uso en combinación con los conjugados de camptotecina preparados mediante los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, también incluyen, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos tales como alcaloides de la vinca, antraciclina, epidofilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, inhibidores de tirosina cinasa, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de Cox-2, antimitóticos, agentes antiangiogénicos y proapoptóticos, particularmente doxorubicina, metotrexato, taxol, otras camptotecinas, y otras de estas y otras clases de agentes anticancerosos y similares. Otros fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen mostazas nitrogenadas, alquil sulfonatos, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejos de coordinación de platino, hormonas y similares. En REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19ª Ed. (Mack Publishing Co. 1995) y en GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7ª Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985), así como en ediciones revisadas de estas publicaciones, se describen agentes quimioterapéuticos adecuados. Los expertos en la técnica conocen otros agentes quimioterapéuticos adecuados, tales como fármacos experimentales.

Como fármacos de uso ejemplares se incluyen, pero sin limitación, 5-fluorouracilo, afatinib, apidina, azaribina, anastrozol, antraciclina, axitinib, AVL-101, AVL-291, bendamustina, bleomicina, bortezomib, bosutinib, briostatina-1, busulfán, caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, 10-hidroxicamptotecina, carmustina, celebex, clorambucilo, cisplatino (CD-DP), inhibidores de Cox-2, irinotecán (CPT-11), SN-38, carboplatino, cladribina, campotecanos, crizotinib, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dasatinib, dinaciclib, docetaxel, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina (2P-DOX), cianomorfolinodoxorrubicina, glucurónido de doxorubicina, glucurónido de epirubicina, erlotinib, estramustina, epidofilotoxina, erlotinib, entinostat, agentes de unión al receptor de estrógeno, etopósido (VP16), glucurónido de etopósido, fosfato de etopósido, exemestano, fingolimod, floxuridina (FUdR), 3',5'-O-dioleoil-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, inhibidores de proteína farnesil transferasa, flavopiridol, fostamatinib, ganetespib, GDC-0834, GS-1101, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, ibrutinib, idarubicina, idelalisib, ifosfamida, imatinib, L-asparaginasa, lapatinib, lenolidamida, leucovorina, LFM-A13, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, navelbina, neratinib, nilotinib, nitrosourea, olaparib, plicomicina, procarbazona, paclitaxel, PCI-32765, pentostatina, PSI-341, raloxifeno, semustina, sorafenib, estreptozocina, SU11248, sunitinib, tamoxifeno, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecán, mostaza de uracilo, vatalanib, vinorelbina, vinblastina, vincristina, alcaloides de la vinca y ZD1839. Dichos agentes pueden formar parte de los conjugados descritos en la presente memoria o de manera alternativa pueden administrarse en combinación con los conjugados descritos, ya sea antes, simultáneamente con o después, del conjugado. De manera alternativa, pueden utilizarse uno o más anticuerpos terapéuticos desnudos, como se conocen en la técnica, en combinación con los conjugados descritos. Anteriormente se han descrito ejemplos de anticuerpos terapéuticos desnudos.

Los agentes terapéuticos que pueden utilizarse junto con los conjugados de camptotecina también pueden comprender toxinas conjugadas con fracciones de direccionamiento. Las toxinas que pueden utilizarse a este respecto incluyen ricina, abrina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antivírica de hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*. (Véase, p. ej., Pastan. *et al.*, Cell (1986), 47:641 y Sharkey y Goldenberg, CA Cancer J Clin. Julio-Agosto de 2006; 56(4):226-43). Los expertos en la técnica conocen toxinas adicionales adecuadas para su uso en la presente memoria y se describen en el documento U.S. 6 077 499.

Otra clase más de agente terapéutico puede comprender uno o más inmunomoduladores. Los inmunomoduladores de uso pueden seleccionarse entre una citocina, un factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF), un interferón (IFN), eritropoyetina, trombopoyetina y una

combinación de los mismos. Son especialmente útiles las linfoquinas 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, tales como interferones- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  o - $\lambda$ , y factor de crecimiento de células madre, tal como el denominado "factor S1".

5 Entre las citocinas se incluyen hormonas de crecimiento, tales como hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento humano N-metionil y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxian; prorelaxina; hormonas glucoproteicas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante

10 (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor  $\alpha$  y  $\beta$  de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento insulínico I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  y - $\lambda$ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); interleucinas (IL), tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , 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 linfoquina (LT). Como se emplea en esta memoria, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

20 Las quimiocinas de utilidad incluyen RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-Beta e IP-10.

### Formulación y administración

Las vías de administración adecuadas de los conjugados incluyen, sin limitación, administración oral, parenteral, rectal, transmucosa, intestinal, inyección intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravenosa o intraperitoneal. La vía de administración preferida es la parenteral. De manera alternativa, el compuesto puede administrarse de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección del compuesto directamente en un tumor sólido.

25 Los inmunconjugados pueden formularse según métodos conocidos para preparar composiciones que sean útiles desde el punto de vista farmacéutico, por lo que el inmunconjugado se combina en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La solución salina estéril tamponada con fosfato es un ejemplo de un excipiente farmacéuticamente adecuado. Los expertos en la técnica conocen bien otros excipientes adecuados. Véase, por ejemplo, Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5ª Edición (Lea & Febiger 1990) y Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª edición (Mack Publishing Company 1990) y ediciones revisadas de estas publicaciones.

35 Preferiblemente, el inmunconjugado se formula en tampón biológico de Good (pH 6-7), utilizando un tampón seleccionado del grupo que consiste en ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES); ácido N-(2-acetamido)iminodiacético (ADA); ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES); ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico (HEPES); ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES); ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS); ácido 3-(N-morfolinil)-2-hidroxipropanosulfónico (MOPSO); y ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico) [Pipes]. Los tampones más preferidos son MES o MOPS, preferiblemente en el intervalo de concentración de 20 a 100 mM, más preferiblemente de aproximadamente 25 mM. Siendo la concentración más preferida de MES 25 mM con un pH de 6,5. La formulación puede comprender además, como excipientes, trehalosa 25 mM y polisorbato 80 al 0,01 % v/v, modificándose la concentración final del tampón a 22,25 mM como resultado de la adición de excipientes. El método de conservación preferido es como una formulación liofilizada de los conjugados, conservada en el intervalo de temperatura de -20°C a 2°C, siendo el intervalo de temperatura de conservación más preferido de 2°C a 8°C.

45 El inmunconjugado puede formularse para administración intravenosa, por ejemplo, mediante inyección en embolada, infusión lenta o infusión continua. Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención se infunde durante un período inferior a aproximadamente 4 horas, y más preferiblemente, durante un período inferior a aproximadamente 3 horas. Por ejemplo, los primeros 25-50 mg se pueden infundir en 30 minutos, preferiblemente incluso en 15 minutos, y el resto se infunde durante las 2-3 horas siguientes. Las formulaciones inyectables pueden presentarse en forma de dosis unitaria, p. ej., en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden estar en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De manera alternativa, antes de su uso, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua esterilizada sin pirógenos.

55 Para controlar la duración de la acción del conjugado terapéutico pueden emplearse métodos farmacéuticos adicionales. Para formar complejos o adsorber el inmunconjugado, pueden prepararse preparaciones de liberación controlada utilizando polímeros. 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 tasa de liberación de un inmunconjugado de dicha matriz depende del

peso molecular del inmunoconjugado, de la cantidad de inmunoconjugado dentro de la matriz y del tamaño de las partículas dispersas. Saltzman *et al.*, *Biophys. J.* 55: 163 (1989); Sherwood *et al.*, mencionados anteriormente. Otras formas de dosificación sólidas se describen en Ansel. *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5ª Edición (Lea & Febiger 1990) y Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª edición (Mack Publishing Company 1990) y ediciones revisadas de estas publicaciones.

En general, la dosis de un inmunoconjugado administrado a seres humanos variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, la afección médica general y el historial médico previo del paciente. Puede ser deseable proporcionar al receptor una dosis de inmunoconjugado que esté en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a 24 mg/kg como una sola infusión intravenosa, aunque también se puede administrar una dosis menor o mayor según lo requieran 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/m<sup>2</sup> para un paciente de 1,7 m. La dosis puede repetirse según sea necesario, por ejemplo, una vez a la semana durante 4-10 semanas, una vez a la semana durante 8 semanas o una vez a la semana durante 4 semanas. También puede administrarse con menos frecuencia, tal como cada dos semanas durante varios meses, o mensualmente o trimestralmente durante muchos meses, según sea necesario en una terapia de mantenimiento. Las dosis preferidas pueden incluir, pero sin limitación, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 22 mg/kg y 24 mg/kg. Puede utilizarse cualquier cantidad en el intervalo de 1 a 24 mg/kg. La dosis se administra preferiblemente varias veces, una o dos veces a la semana. Se puede utilizar una pauta de dosificación mínima de 4 semanas, más preferiblemente de 8 semanas, más preferiblemente de 16 semanas o mayor. La pauta de administración puede comprender la administración una o dos veces a la semana, en un ciclo seleccionado del grupo que consiste en: (i) todas la semanas; (ii) cada dos semanas; (iii) una semana de terapia seguida de dos, tres o cuatro semanas de descanso; (iv) dos semanas de terapia seguidas de una, dos, tres o cuatro semanas de descanso; (v) tres semanas de terapia seguidas de una, dos, tres, cuatro o cinco semanas de descanso; (vi) cuatro semanas de terapia seguidas de una, dos, tres, cuatro o cinco semanas de descanso; (vii) cinco semanas de terapia seguidas de una, dos, tres, cuatro o cinco semanas de descanso; y (viii) una vez al mes. El ciclo puede repetirse 4, 6, 8, 10, 12, 16 o 20 veces o más.

De manera alternativa, un inmunoconjugado puede administrarse como una dosis cada 2 o 3 semanas, que se repite durante un total de al menos 3 dosis. O, dos veces por semana durante 4-6 semanas. Si la dosis se reduce a aproximadamente 200-300 mg/m<sup>2</sup> (340 mg por dosis para un paciente de 1,7 m o 4,9 mg/kg para un paciente de 70 kg), se puede administrar una o incluso dos veces por semana durante 4 a 10 semanas. De manera alternativa, la pauta de dosificación puede reducirse, concretamente cada 2 o 3 semanas durante 2-3 meses. Sin embargo, se ha determinado que pueden administrarse dosis incluso mayores, tal como de 12 mg/kg, una vez a la semana o una vez cada 2-3 semanas, mediante infusión i.v. lenta, durante ciclos de dosificación repetidos. Opcionalmente, la pauta de dosificación puede repetirse a otros intervalos y la dosificación puede administrarse a través de diversas vías parenterales, ajustando apropiadamente la dosis y la pauta.

Los inmunoconjugados preparados mediante los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, son útiles para la terapia del cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma y leucemia, mieloma o neoplasias malignas linfocíticas. A continuación se indican ejemplos más particulares de dichos cánceres e incluyen: cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer de células escamosas epiteliales), sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, astrocitomas, cáncer de pulmón, incluido cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer peritoneal, cáncer de estómago o gástrico, incluido el cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, carcinoma hepatocelular, tumores neuroendocrinos, cáncer medular tiroideo, carcinoma tiroideo diferenciado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, carcinoma de ano, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello. El término "cáncer" incluye células o tumores malignos primarios (p. ej., aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto que no sean el sitio de la neoplasia maligna o tumor original) y células o tumores malignos secundarios (p. ej., aquellos que surgen de metástasis, la migración de células malignas o células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

Otros ejemplos de cánceres o neoplasias malignas incluyen, pero sin limitación: leucemia linfoblástica infantil aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma de la corteza suprarrenal, 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 primario de hígado en adultos, sarcoma de tejidos blandos en adultos, linfoma relacionado con el SIDA, neoplasias malignas relacionadas con el SIDA, cáncer de ano, astrocitoma, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de pelvis renal y uréter, linfoma (primario) del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer hepatocelular infantil (primario), cáncer de hígado infantil (primario), leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma del tronco encefálico infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumor extracraneal infantil de células germinales, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin infantil, glioma hipotalámico y de las vía ópticas infantiles, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no Hodgkin infantil, tumores

neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineales infantiles, cáncer primario de hígado infantil, rabdomiosarcoma infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, glioma hipotalámico y de las vía ópticas infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, carcinoma endocrino de células de los islotes del páncreas, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, cáncer de 5 esófago, sarcoma de Ewing y tumores relacionados, cáncer pancreático exocrino, tumor extracraneal de células germinales, Tumor extragonadal de células germinales, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, cáncer de mama en mujeres, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores gastrointestinales, tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, tricoleucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin, hipergammaglobulinemia, cáncer 10 de hipofaringe, cánceres intestinales, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, cáncer pancreático de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad bucal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, trastornos linfoproliferativos, macroglobulinemia, cáncer de mama en hombres, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello con tumor primario oculto, cáncer escamoso metastásico de cuello con tumor primario, cáncer escamoso 15 metastásico de cuello, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de la cavidad nasal y de seno paranasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer escamoso metastásico de cuello con tumor primario oculto, cáncer de orofaringe, sarcoma óseo fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, 20 cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno, cáncer pancreático, paraproteinemia, policitemia vera, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor pituitario, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer primario de hígado, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal y de uréteres, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoidosis y sarcomas, síndrome de Sézary, cánceres de piel, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de 25 intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de cuello de células escamosas, cáncer de estómago, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineales, linfoma de células T, cáncer testicular, timoma, cáncer tiroideo, cáncer de células de transición de pelvis renal y de uréteres, cáncer de células de transición de pelvis renal y de uréteres, tumores trofoblásticos, cáncer de células de pelvis renal y de uréteres, cáncer de uretra, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de vagina, glioma hipotalámico y de las vía ópticas, cáncer de vulva, macroglobulinemia de 30 Waldenström, tumor de Wilms y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, localizada en un sistema de órganos enumerados anteriormente.

Los inmunconjugados preparados mediante los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, pueden utilizarse para tratar afecciones malignas o premalignas y para prevenir la progresión a un estado neoplásico o maligno., incluidos, pero sin limitación, los trastornos descritos anteriormente. Dichos usos están indicados en 35 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 anómalo, véase Robbins y Angell, Basic Pathology, 2ª Ed., W. B. Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-79 (1976)).

La displasia es con frecuencia un precursor del cáncer y se encuentra principalmente en el epitelio. Es la forma más 40 desordenada de crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida en la uniformidad celular individual y en la orientación arquitectónica de las células. La displasia se produce característicamente cuando existe irritación o inflamación crónica. Los trastornos displásicos que pueden tratarse incluyen, pero sin limitación, displasia ectodérmica anhidrótica, displasia anterofacial, displasia torácica asfíxica, displasia atriodigital, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia de cuello uterino, displasia condroectodérmica, displasia cleidocraneal, displasia 45 ectodérmica congénita, displasia craneodifisaria, displasia craneocarpotarsal, displasia craneometafisaria, displasia de la dentina, displasia diafisial, displasia ectodérmica, displasia del esmalte, displasia encefalooftálmica, displasia epifisaria hemimélica, displasia epifisaria múltiple, displasia epifisaria punctata, displasia epitelial, displasia faciodigitogenital, displasia fibrosa familiar maxilar, displasia familiar de pliegues blancos, displasia fibromuscular, displasia fibrosa de hueso, displasia ósea florida, displasia renal-retiniana hereditaria, displasia ectodérmica hidrótica, 50 displasia ectodérmica hipohidrótica, displasia tímica linfopénica, displasia mamaria, displasia mandibulofacial, displasia metafisaria, displasia de Mondini, displasia fibrosa monostótica, displasia mucoepitelial, displasia epifisaria múltiple, displasia oculoauriculovertebral, displasia oculodentodigital, displasia oculovertbral, displasia odontogénica, displasia oftalmomandibulomélica, displasia cementaria periapical, displasia fibrosa poliostótica, displasia pseudocondroplásica espondiloepifisaria, displasia de retina, displasia septoóptica, displasia espondiloepifisaria y 55 displasia ventriculoradial.

Los trastornos preneoplásicos adicionales que pueden tratarse incluyen, pero sin limitación, trastornos disproliferativos benignos (p. ej., 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.

Preferiblemente, el método de la descripción se utiliza para inhibir el crecimiento, la progresión y/o metástasis de 60 cánceres, en particular los enumerados anteriormente.

Como enfermedades, afecciones y/o trastornos hiperproliferativos adicionales se incluyen, pero sin limitación, progresión y/o metástasis de neoplasias malignas y trastornos relacionados tales como leucemia (incluyendo

leucemias agudas; p. ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda [incluyendo leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia] y leucemias crónicas (p. ej., leucemia mielocítica [granulocítica] crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadenas pesadas y tumores sólidos, incluyendo, pero sin limitación, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse con los inmunoconjugados pueden incluir trombocitopenias inmunitarias agudas y crónicas, dermatomiositis, corea de Sydenham, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide ampolloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nodular, arteritis de Takayasu, vasculitis asociadas a ANCA, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía por IgA, panarteritis nodular, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, síndrome de Sjogren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis activa crónica, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis o alveolitis fibrosante.

#### Kits

La descripción también proporciona kits que contienen componentes adecuados para tratar tejido enfermo en un paciente. Los kits ejemplares pueden contener al menos un anticuerpo conjugado u otra fracción de direccionamiento como se describe en la presente memoria. Si la composición que contiene los componentes para la administración no está formulada para su suministro a través del tubo digestivo, tal como mediante suministro por vía oral, puede incluirse un dispositivo capaz de suministrar los componentes del kit a través de alguna otra vía. Un tipo de dispositivo, para aplicaciones tales como suministro parenteral, es una jeringa que se utiliza para inyectar la composición en el cuerpo de un sujeto. También pueden utilizarse dispositivos para inhalación.

Los componentes del kit pueden envasarse juntos o separados en dos o más envases. En algunas realizaciones, los envases pueden ser viales que contienen formulaciones estériles liofilizadas de una composición que son adecuadas para la reconstitución. Un kit también puede contener uno o más tampones adecuados para la reconstitución y/o dilución de otros reactivos. Otros envases que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, una bolsa, una bandeja, una caja, un tubo, o similar. Los componentes del kit pueden envasarse y guardarse esterilizados en los envases. Otro componente que puede incluirse son las instrucciones de uso para la persona que va a utilizar el kit.

#### Ejemplos

##### Generalidades

Las abreviaturas que se utilizan a continuación son: DCC, diciclohexilcarbodiimida; NHS, N-hidroxisuccinimida, DMAP, 4-dimetilaminopiridina; EEDQ, 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina; MMT, monometoxitritilo; PABOH, alcohol-*p*-aminobenzílico; PEG, polietilenglicol; SMCC, succinimidil 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato; TBAF, fluoruro de tetrabutylamonio; TBDMS, cloruro de terc-butildimetilsililo.

En los siguientes ejemplos, los cloroformatos de compuestos hidroxilo se prepararon utilizando trifosgeno y DMAP según el procedimiento descrito en Moon *et al.* (J. Medicinal Chem. 51:6916-6926, 2008), que se incorpora por referencia. 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 ultrarrápida se realizó utilizando gel de sílice de malla 230-400 y gradiente de metanol-diclorometano, utilizando hasta un 15 % v/v de metanol-diclorometano, a menos que se indique otra cosa. 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 del 100 % de disolvente A al 100 % de disolvente B durante 10 minutos a un caudal de 3 ml por minuto y manteniendo al 100 % de disolvente B a un caudal de 4,5 ml por minuto durante 5 o 10 minutos; o mediante el Método B utilizando una columna Xbridge C18 de 4,6x30 mm, 2,5 µm, equipada con un filtro de precolumna, utilizando el gradiente de disolvente del 100 % de disolvente A al 100 % de disolvente B a un caudal de 1,5 ml por minuto durante 4 min y del 100 % de disolvente B a un caudal de 2 ml por minuto durante 1 minuto. El disolvente A era acetato de amonio acuoso al 0,3 %, a un pH de 4,46, mientras que el disolvente B era acetonitrilo-acetato de amonio acuoso 9:1 (0,3 %), a un pH de 4,46. La HPLC se monitorizó mediante un detector de absorbancia

doble en línea fijado a 360 nm y 254 nm.

### Ejemplo 1: Preparación de CL2A-SN-38

En la FIG. 1 se muestra un esquema de reacción preferido para la síntesis de CL2A-SN-38, que comprende las siguientes etapas para mejorar el proceso de fabricación a gran escala.

5 Preparación de O-(2-Azidoetil)-O'-[(N-diglicolil-2-aminoetil)-Lys(MMT)-PABOH]heptaetilenglicol (producto intermedio 3, FIG. 1): En un matraz de una boca de 500 ml, se añadieron Fmoc-Lys(MMT)-OH (16 g), alcohol-*p*-aminobenzílico (3,26 g) y EEDQ (6,52 g) disponibles en el comercio, seguido de diclorometano anhidro (80 ml). Después de agitar durante la noche, se añadió dietilamina (25 ml) y, después de 6 h más, la mezcla de reacción se concentró hasta un volumen de ~ 50 ml. Esta mezcla se diluyó con heptano y la solución se concentró de nuevo a 50 ml. Dos capturas  
10 adicionales con heptano (50 ml cada una) proporcionaron una mezcla bifásica que contenía material gomoso en la parte inferior. El material gomoso se recogió en diclorometano (24 ml), se agitó y se trató con una adición lenta de heptano (80 ml). Después de agitar durante 1 hora, la suspensión se filtró para obtener 13,02 g (rendimiento del 99,6 %) de Lys(MMT)-PABOH (producto intermedio 2, Fig 1). Opcionalmente, el material se purificó además mediante cromatografía si había dietilamina residual. El producto Lys(MMT)-PABOH (11,51 g) se mezcló con una solución de  
15 O-(2-azidoetil)-O'-[(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol (PEG-N<sub>3</sub>; 12,107 g) en diclorometano anhidro (90 ml). A esta solución agitada se le añadió EEDQ (5,54 g). Después de ~ 18 horas, la mezcla de reacción se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice, utilizando elución en gradiente de acetato de etilo-metanol, para obtener el producto del título puro (producto intermedio 3, Fig 1).

Preparación de TBDMS-SN-38 (producto intermedio 4, FIG. 1): La preparación se modificó al utilizar como disolvente  
20 diclorometano en lugar de dimetilformamida, lo que permitió facilitar la preparación. Se añadió una solución de diisopropiltilamina (36,6 g) en diclorometano anhidro (160 ml) a SN-38 (33 g). La suspensión se enfrió en un baño de hielo/agua y se agitó. A esta suspensión agitada se le añadió una solución de cloruro de ter-butildimetilsililo (31,72 g) en diclorometano (125 ml). Se retiró el baño frío y la mezcla de reacción se agitó durante 4 horas. La mezcla de reacción transparente se lavó con 380 ml de HCl 0,2 M en una solución de cloruro de sodio al 10 % y 300 ml de una  
25 solución de cloruro de sodio al 10 %. El producto, después del secado y la eliminación del disolvente, se precipitó en acetato de etilo-heptano para obtener 38,75 g (rendimiento del 91 %) de TBDMS-SN-38.

#### Generación de 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-cloroformiato (producto intermedio reactivo 5.

FIG. 1) y preparación de O-(2-azidoetil)-O'-[(N-diglicolil-2-aminoetil)-Lys(MMT)-PABOCO-20-O-SN-38]heptaetilenglicol (producto intermedio 7, FIG. 1): Para evitar una gran exotermia por la adición en embolada de las  
30 cantidades requeridas de trifosgeno, se ideó un proceso mejorado añadiendo una solución de trifosgeno (0,24 g) en diclorometano anhidro (4 ml), durante 30 minutos, a una mezcla agitada de 0,94 g de TBDMS-SN-38 y DMAP (0,76 g) en diclorometano (17 ml). Esto dio como resultado una conversión del 98,5 % en un producto intermedio reactivo (5 en la Fig. 1), según se determinó mediante análisis por HPLC de una alícuota desactivada de la mezcla de reacción, desactivada con metanol anhidro. De este modo se garantizó la formación limpia del producto requerido, sin indicios  
35 de la formación de un material dimérico debido a la desactivación del cloroformiato inicialmente formado con SN-38 sin reaccionar. Mientras que la adición en embolada dio como resultado una gran exotermia de 5,8° C a 17,6° C, la adición lenta mantuvo la temperatura interna a <10° C en todo momento, sin comprometer la calidad de la reacción. Se repitió el mismo enfoque utilizando 11,25 g (22,2 mmol) de TBDMS-SN-38 en 250 ml de diclorometano anhidro y utilizando proporcionalmente otros reactivos como se ha descrito anteriormente para la reacción a pequeña escala. Después de 15 min, se añadió una solución de 25,01 g de O-(2-Azidoetil)-O'-[(N-diglicolil-2-aminoetil)-Lys(MMT) -  
40 PABOH]heptaetilenglicol (producto intermedio 3, Figura 1) en diclorometano (125 ml) durante 8 min. Después de 75 min, la mezcla de reacción se lavó secuencialmente con tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,3, agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después, la solución del producto se agitó con una mezcla de fluoruro de tetrabutamonio 1 M en tetrahidrofurano (31 ml), diclorometano anhidro (34 ml) y ácido acético (3 ml). Después de 2  
45 horas, la mezcla de reacción se lavó con tampón citrato 0,25 M, pH 6, agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Una cromatografía sobre gel de sílice, con gradiente de elución con mezclas de metanol-cloruro de metileno, proporcionó 17,3 g (rendimiento del 52 %) del producto del título (producto intermedio 7, FIG. 1).

Preparación de CL2A-SN-38 (FIG. 1): O-(2-azidoetil)-O'-[(N-diglicolil-2-aminoetil)-Lys(MMT)-PABOCO-20-O-SN-38]heptaetilenglicol (producto intermedio 7, FIG. 1; 10,2 g) en diclorometano anhidro (130 ml) se mezcló con 4-(N-  
50 maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexan-1-carboxamida (producto intermedio 8 ["MCC-yne"] Figura 1); 3,78 g). A esto, se añadió una mezcla de trifenilfosfina (0,38 g), bromuro cuproso (0,24 g) y diisopropiltilamina (0,25 ml) en diclorometano (100 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. El material se concentró y se purificó por cromatografía; la solución de producto puro se lavó con EDTA, agua y salmuera. El producto,  
55 O-{2-[(1,2,3-triazolil)-4-[4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxamidometil]]etil}-O'-[(N-diglicolil-2-aminoetil)-Lys(MMT)-PABOCO-20-O-SN-38]heptaetilenglicol (producto intermedio 9, FIG. 1), se obtuvo a una cantidad de 10,8 g (rendimiento del 89 %), que fue mejor que el rendimiento máximo de 67 % obtenido anteriormente. Este procedimiento modificado mejoró el rendimiento debido al tiempo de reacción reducido (14 horas frente a 18-41 horas) y también evitó un problema de estabilidad encontrado anteriormente con el producto intermedio 9 al realizar primero la cromatografía y después la extracción con EDTA. La solución del producto en diclorometano se mezcló con anisol (2,8 g), se enfrió a <5° C y se hizo reaccionar con ácido dicloroacético (5,8 g) durante 2 horas. El producto final, CL2A-

SN-38, se precipitó de terc-butilmetiléter con un rendimiento global (en 2 etapas) del 81 %.

### Ejemplo 2. Conjugación de CL2A-SN-38 con anticuerpos

En estos estudios se utilizaron los siguientes MAb (anticuerpos monoclonales) humanizados, anti-CEACAM5, hMN-14, anti-CD22, hLL2, anti-CD20, hA20, anti-EGP-1, hRS7 y anti-mucina, hPAM4. Cada anticuerpo se redujo suavemente con Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) en tampón fosfato a un pH en el intervalo de 7-7,4, el pH se ajustó a 6,5 y se hizo reaccionar con un exceso molar de ~ 10 veces de CL2A-SN-38 utilizando como codisolvente DMSO al 5-10 % v/v e incubando durante 20 min a temperatura ambiente. Cualquier exceso de tiol se protegió con N-etilmaleimida utilizada como una solución acuosa en un exceso molar de 10 veces con respecto al anticuerpo.

El conjugado se purificó mediante filtración de flujo tangencial (FFT), utilizando 20-30 volúmenes de diafiltración del tampón de formulación final, MES 25 mM, a un pH de 6,5. Este método evitó la engorrosa purificación secuencial en columnas de exclusión por tamaño e hidrófobas, permitiendo así purificar cientos de gramos de conjugados de una manera fácil. El producto se ensayó para SN-38 mediante absorbancia a 366 nm y se correlacionó con valores estándar. La concentración proteica se dedujo de la absorbancia a 280 nm, corregida por el desbordamiento de la absorbancia de SN-38 a esta longitud de onda. A partir de esto, se determinaron las proporciones de sustitución de SN-38/MAb (DAR, siglas del inglés *Drug Ab Ratio*, proporciones de fármaco y anticuerpo). Los conjugados purificados se conservaron como formulaciones liofilizadas en viales de vidrio, se taparon al vacío y se conservaron en un congelador a -20° C. En la tabla 6 se muestran las DAR obtenidas para algunos de estos conjugados, que normalmente estaban en el intervalo de 5 a 7.

**Tabla 6: Proporciones de Fármaco/Anticuerpo monoclonal (MAb) (DAR) SN-38/MAb en algunos conjugados**

MAb	Conjugado	DAR
hMN-14	hMN-14-[CL2A-SN-38]	6,1
hRS7	hRS7-CL2A-SN-38	5,8
hA20	hA20-CL2A-SN-38	5,8
hLL2	hLL2-CL2A-SN-38	5,7
hPAM4	hPAM4-CL2A-SN-38	5,9

### Ejemplo 3. Eficacia terapéutica *in vivo* en modelos preclínicos de carcinoma pancreático o de colon humano

Ratonas lampiñas atímicas inmunocomprometidas, portadoras de xenoinjertos subcutáneos de tumor pancreático o de colon humano, se trataron con conjugado CL2A-SN-38 específico o con conjugado de control o no se trataron. Se observaron las eficacias terapéuticas de los conjugados específicos. En la FIG. 2 se muestra un modelo de tumor pancreático Capan 1, en donde los conjugados CL2A-SN-38 específicos de hRS7 (anti-EGP-1), hPAM4 (anti-mucina) y hMN-14 (anti-CEACAM5) mostraron mejores eficacias que el conjugado hA20-CL2A-SN-38 (anti-CD20) de control y control sin tratar. De manera similar, en un modelo BXPC3 de cáncer pancreático humano, el conjugado hRS7-CL2A-SN-38 específico mostró una mejor eficacia terapéutica que los tratamientos de control (FIG. 3). Del mismo modo, en un modelo LS174T agresivo de carcinoma de colon humano, el tratamiento con hMN-14-CL2A-SN-38 específico fue más eficaz que el no tratamiento (FIG. 4).

### Ejemplo 4. Uso del conjugado IgG anti-TROP-2 humanizado-SN-38 para el tratamiento eficaz de diversos cánceres epiteliales

El propósito de este estudio fue evaluar la eficacia de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC, *antibody-drug conjugate*) SN-38-anti-TROP-2 contra varios tipos de tumores sólidos humanos y evaluar su tolerabilidad en ratones y monos, los últimos con reactividad cruzada tisular contra hRS7 similar a la de los seres humanos. Dos derivados de SN-38, CL2-SN-38 (véase la patente de Estados Unidos N.º 7.591.994) y CL2A-SN-38, se conjugaron con el anticuerpo anti-TROP-2-humanizado, hRS7. Los inmunconjugados se caracterizaron *in vitro* con respecto a su estabilidad, unión y citotoxicidad. La eficacia se analizó en cinco modelos diferentes de xenoinjerto de tumor sólido humano que expresaban el antígeno TROP-2. La toxicidad se evaluó en ratones y en monos cinomolgos.

Los conjugados de hRS7 de los dos derivados de SN-38, fueron equivalentes en cuanto a la sustitución de fármacos (~ 6), unión celular ( $K_d \sim 1,2$  nmo/l), citotoxicidad ( $Cl_{50} \sim 2,2$  nmo/l) y estabilidad en suero *in vitro* ( $t_{1/2} \sim 20$  horas). La exposición de las células al ADC puso de manifiesto rutas de señalización que conducían a la escisión de la PARP, pero se observaron diferencias frente a SN-38 libre en la regulación positiva de p53 y p21. hRS7-SN-38 produjo efectos antitumorales significativos a dosis no tóxicas en ratones portadores de Calu-3 ( $P \leq 0,05$ ), Capan-1 ( $P < 0,018$ ), BxPC-3 ( $P < 0,005$ ) y tumores COLO 205 ( $P < 0,033$ ) en comparación con los ADC de control inespecíficos. Los ratones toleraron una dosis de  $2 \times 12$  mg/kg (equivalentes de SN-38) con solo elevaciones de corta duración en los niveles de las enzimas hepáticas ALT y AST. Los monos cinomolgos infundidos con  $2 \times 0,96$  mg/kg mostraron solo disminuciones transitorias en los hemogramas, a pesar de que, de manera significativa, los valores no cayeron por debajo de los intervalos normales.

Se llegó a la conclusión de que el ADC anti-TROP-2 hRS7-CL2A-SN-38 proporcionó efectos antitumorales significativos y específicos contra una variedad de tipos de tumores sólidos humanos. Los monos lo toleraron bien, con una expresión de TROP-2 tisular similar a la de los seres humanos. (Cardillo *et al.*, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69.)

5 El tratamiento satisfactorio con irinotecán de pacientes con tumores sólidos ha sido limitado debido en gran parte a la baja tasa de conversión del profármaco CPT-11 en el metabolito activo SN-38. Otros han examinado formas inespecíficas de SN-38 como un medio para evitar la necesidad de esta conversión y suministrar SN-38 de forma pasiva a los tumores. Se ha conjugado SN-38 de manera covalente con un anticuerpo anti-TROP-2 humanizado, hRS7. Este conjugado de anticuerpo-fármaco tiene efectos antitumorales específicos en una variedad de modelos de xenoinjerto de cáncer humano s.c., incluyendo el carcinoma de pulmón no microcítico, carcinomas pancreáticos, colorrectales y de pulmón de células escamosas, todos ellos en dosis no tóxicas (p. ej.,  $\leq 3,2$  mg/kg de dosis equivalente acumulada de SN-38).

10 TROP-2 se expresa ampliamente en muchos cánceres epiteliales, pero también en algunos tejidos normales y, por lo tanto, se realizó un estudio de aumento de dosis en monos cinomolgos para evaluar la seguridad clínica de este conjugado. Los monos toleraron 24 mg SN-38 equivalentes/kg con sólo toxicidades menores y reversibles. Dado su perfil de seguridad y direccionamiento a los tumores, hRS7-CL2A-SN-38 puede proporcionar una mejora en el tratamiento de tumores sólidos que responden a irinotecán.

15 El antígeno de la superficie celular del trofoblasto humano (TROP-2), también conocido como GA733-1 (antígeno gástrico 733-1), EGP-1 (glucoproteína epitelial 1) y TACSTD2 (transductor de señales de calcio asociado a tumores), se expresa en diversos carcinomas humanos y tiene importancia pronóstica en algunos, al estar asociado a enfermedades más agresivas (véase, p. ej., Alberti *et al.*, 1992, Hybridoma 11:539-45; Stein *et al.*, 1993, Int J Cancer 55:938-46; Stein *et al.*, 1994, Int J Cancer Suppl. 8:98-102). Los estudios sobre el papel funcional de TROP-2 en una línea celular de cáncer pancreático de ratón transfectada con TROP-2 murino, revelaron un aumento de la proliferación en condiciones séricas bajas, migración y crecimiento independiente del anclaje *in vitro*, y un aumento de la tasa de crecimiento con indicios de una mayor expresión de Ki-67 *in vivo* y una mayor probabilidad de metástasis (Cubas *et al.*, 2010, Mol Cancer 9:253).

20 La distribución del antígeno TROP-2 en muchos cánceres epiteliales lo convierte en una diana terapéutica atractiva. Stein y colaboradores (1993, Int J Cancer 55: 938-46) caracterizaron un anticuerpo, denominado RS7-3G11 (RS7), que se unía a EGP-1, que estaba presente en diversos tumores sólidos, pero el antígeno también se expresaba en algunos tejidos normales, normalmente en una intensidad más baja, o en regiones restringidas. Utilizando el anticuerpo RS7 radiomarcado se documentaron las eficacias terapéuticas y el direccionamiento en diversos xenoinjertos de tumores humanos (Shih *et al.*, 1995, Cancer Res 55:5857s-63s; Stein *et al.*, 1997, Cancer 80:2636-41; Govindan *et al.*, 2004, Breast Cancer Res Treat 84: 173-82), pero este anticuerpo internalizante no mostró actividad terapéutica en forma no conjugada (Shih *et al.*, 1995, Cancer Res 55:5857s-63s). Sin embargo, ha demostrado *in vitro* actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra carcinomas positivos a TROP-2.

30 Se informa sobre la preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, *antibody-drug conjugates*) utilizando una IgG anti-CEACAM5 (CD66e) acoplada a varios derivados de SN-38, un inhibidor de topoisomerasa I que es el componente activo de irinotecán, o CPT-11 (Moon *et al.*, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan *et al.*, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61). Los derivados variaban en cuanto a sus propiedades de estabilidad sérica *in vitro*, y en estudios *in vivo* se descubrió que una forma (denominada CL2) era más eficaz para impedir o detener el crecimiento de los xenoinjertos de cáncer de colon y de páncreas humanos que otros enlaces con más o menos estabilidad.

35 De manera significativa, estos efectos se produjeron a dosis no tóxicas, con pruebas iniciales que no pudieron determinar una toxicidad limitante de la dosis (Govindan *et al.*, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61). Estos resultados fueron alentadores, pero también sorprendentes, porque el anticuerpo CEACAM5 no se internaliza, una propiedad que se considera fundamental para el éxito de un ADC. Se especuló que la actividad terapéutica del conjugado anti-CEACAM5-SN-38 podría estar relacionada con la liberación lenta de SN-38 dentro del tumor después de la localización del anticuerpo. Debido a que el irinotecán funciona mejor cuando las células están expuestas durante la fase S de su ciclo de crecimiento, se espera que una liberación sostenida mejore las respuestas. De hecho, SN-38 acoplado a agentes inespecíficos, extensores en plasma, tales como polietilenglicol (PEG) o micelas, ha demostrado una eficacia mejorada sobre irinotecán o SN-38 solo (p. ej., Koizumi *et al.*, 2006, Cancer Res 66: 10048-56), lo que brinda apoyo adicional a este mecanismo.

45 Dada la amplia reactividad del anticuerpo RS7 con los cánceres epiteliales y su capacidad de internalización, se planteó la hipótesis de que un conjugado RS7-SN-38 podría beneficiarse no solo de la liberación sostenida del fármaco, sino también del suministro intracelular directo. Por lo tanto, se preparó y analizó la eficacia de los conjugados de SN-38 utilizando una versión humanizada del anticuerpo RS7 murino (hRS7). Se hizo una modificación al derivado de SN-38 (Govindan *et al.*, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61), que mejoró la calidad del conjugado sin alterar su estabilidad *in vitro* ni su eficacia *in vivo*. Este nuevo derivado (denominado CL2A) es actualmente el agente preferido para el acoplamiento de SN-38 a anticuerpos. En la presente memoria, se muestra la eficacia del conjugado hRS7-SN-38 en varias líneas celulares de cáncer epitelial implantadas en ratones lampiños en dosis no tóxicas, revelando otros estudios que se podrían tolerar dosis sustancialmente más altas. Lo que es más importante, estudios de toxicidad en monos que también expresan TROP-2 en tejidos similares a los humanos, mostraron que hRS7-CL2A-SN-38 se

toleraba en cantidades apreciablemente más altas que la dosis terapéuticamente eficaz en ratones, proporcionando indicios de que este conjugado es un agente prometedor para el tratamiento de pacientes con una amplia gama de cánceres epiteliales.

#### *Materiales y Métodos*

5 Líneas celulares, anticuerpos y agentes quimioterapéuticos. Todas las líneas de células de cáncer humano utilizadas en este estudio se adquirieron en la colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*). Esta líneas incluían Calu-3 (carcinoma de pulmón no microcítico), SK-MES-1 (carcinoma de pulmón de células escamosas), COLO 205 (adenocarcinoma de colon), Capan-1 y BxPC-3 (adenocarcinomas pancreáticos) y PC-3 (adenocarcinomas de prostáticos). En Immunomedics, Inc. se prepararon anticuerpos de IgG RS7 humanizados y anti-CD20 (IgG hA20, veltuzumab) y anti-CD22 (IgG hLL2, epratuzumab) humanizados de control. Inc. El irinotecán (20 mg/ml) se obtuvo en Hospira, Inc.

15 Inmunoconjugados de SN-38 y aspectos *in vitro*. La síntesis de CL2-SN-38 se ha descrito anteriormente (Moon *et al.*, 2008, J Med Chem 51:6916-26, véase también la patente de Estados Unidos N.º 7.591.994). Su conjugación con la IgG hRS7 y la estabilidad en suero se realizaron como ha descrito (Moon *et al.*, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan *et al.*, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61). Las preparaciones de CL2A-SN-38 (M.W. 1480) y de su conjugado hRS7, y los estudios de estabilidad, unión y citotoxicidad, se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente (Moon *et al.*, 2008, J Med Chem 51:6916-26). Se prepararon lisados celulares y se realizó inmunotransferencia de p21<sup>Waf1/Cip</sup>, p53 y PARP (poli-ADP-ribosa polimerasa).

20 Estudios terapéuticos *in vivo*. En todos los estudios con animales, las dosis de inmunoconjugados de SN-38 e irinotecán se muestran en equivalentes de SN-38. Basándose en una proporción de sustitución media de SN-38/IgG de 6, una dosis de 500 µg de ADC para un ratón de 20 g (25 mg/kg) contiene 0,4 mg/kg de SN-38. Las dosis de irinotecán también se muestran como equivalentes de SN-38 (es decir, 40 mg de irinotecán/kg equivalen a 24 mg/kg de SN-38). En Taconic Farms se adquirieron ratonas lampiñas atímicas (nu/nu) NCr de 4 a 8 semanas de vida y ratones Swiss-Webster de 10 semanas de vida. Se realizaron estudios de tolerabilidad en monos cinomolgos (*Macaca fascicularis*; macho y hembra de 2,5-4 kg) en SNBL USA, Ltd. A los animales se les implantaron por vía subcutánea diferentes líneas celulares de cáncer humano. El volumen tumoral (VT) se determinó mediante mediciones en 2 dimensiones utilizando calibradores, con volúmenes definidos como:  $L \times w^2/2$ , donde  $L$  es la dimensión más larga del tumor y  $w$  es la más corta. El tamaño de los tumores variaba entre 0,10 y 0,47 cm<sup>3</sup> al inicio de la terapia. En el apartado de Resultados se describen los regímenes de tratamiento, las dosis y el número de animales de cada experimento. El hRS7-CL2A-SN-38 liofilizado y el ADC de control se reconstituyeron y diluyeron según se requirió en solución salina estéril. Todos los reactivos se administraron por vía intraperitoneal (0,1 ml), excepto irinotecán, que se administró por vía intravenosa. El régimen de dosificación estaba influenciado por nuestras investigaciones anteriores, donde el ADC se suministró cada 4 días o dos veces por semana durante períodos de tiempo variables (Moon *et al.*, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan *et al.*, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61). Esta frecuencia de dosificación reflejó una consideración de la semivida en suero del conjugado *in vitro*, para permitir una exposición más continua al ADC.

35 Datos estadísticos. Las curvas de crecimiento se determinaron como cambio porcentual en el VT inicial a lo largo del tiempo. El análisis estadístico del crecimiento tumoral se basó en el área bajo la curva (ABC). Se obtuvieron perfiles de crecimiento de tumores individuales mediante modelado de curvas lineales. Se empleó una prueba  $f$  para determinar la igualdad de varianza entre grupos antes del análisis estadístico de las curvas de crecimiento. Para evaluar la significación estadística entre los diversos grupos de tratamiento y controles se utilizó una prueba  $t$  bilateral (*2-tailed*), excepto para control con solución salina, donde se utilizó una prueba  $t$  unilateral (significación a  $P \leq 0,05$ ). Las comparaciones estadísticas de las ABC se realizaron solo hasta el momento en que el primer animal de un grupo se sacrificó debido a la progresión.

45 Farmacocinética y biodistribución. Ratones lampiños portadores de tumores SK-MES-1 (~ 0,3 cm<sup>3</sup>) s.c. recibieron una inyección de hRS7-CL2A-SN-38 e IgG hRS7 radiomarcados con <sup>111</sup>In. Un grupo recibió una inyección intravenosa de 20 µCi (250 µg de proteína) de <sup>111</sup>In-hRS7-CL2A-SN-38, mientras que otro grupo recibió 20 µCi (250 µg de proteína) de <sup>111</sup>In-IgG hRS7. A diversos puntos temporales los ratones (5 por punto temporal) se anestesiaron, su sangre se extrajo mediante punción intracardiaca y después se sacrificaron. Se extirparon tumores y varios tejidos, se pesaron y para determinar el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g) se efectuó un recuento mediante centelleo y (gamma). Tres días antes de la administración de <sup>111</sup>In-hRS7-CL2A-SN-38, un tercer grupo recibió una inyección de 250 µg de hRS7-CL2A-SN-38 sin marcar y la necropsia se efectuó del mismo modo. Se utilizó una prueba  $t$  bilateral para comparar la captación de hRS7-CL2A-SN-38 e IgG hRS7 después de determinar la igualdad de varianza utilizando la prueba  $f$ . El análisis farmacocinético sobre la eliminación de la sangre se realizó utilizando el programa informático WinNonLin (Parsight Corp.).

55 Tolerabilidad en ratones Swiss-Webster y en monos cinomolgos. En resumen, los ratones se clasificaron en 4 grupos cada uno de ellos para recibir inyecciones i.p. de 2 ml de un control de tampón de acetato de sodio o de 3 dosis diferentes de hRS7-CL2A-SN-38 (4, 8 o 12 mg/kg de SN-38) los días 0 y 3 seguido de extracción de sangre y suero, como se describe en el apartado de Resultados. A los monos cinomolgos (3 machos y 3 hembras; 2,5-4,0 kg) se les administraron 2 dosis diferentes de hRS7-CL2A-SN-38. En el apartado de Resultados se describen las dosis, los tiempos y el número de monos cuya sangre se extrajo para la evaluación de posibles toxicidades hematológicas y

60

análisis bioquímico del suero.

### Resultados

**Estabilidad y fuerza de hRS7-CL2A-SN-38.** Se utilizaron dos enlaces diferentes para conjugar SN-38 con la IgG hRS7. El primero se denominó CL2-SN-38 y se ha descrito anteriormente (Moon *et al.*, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan *et al.*, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61). Se realizó un cambio en la síntesis del enlazador CL2 en el sentido de que se eliminó la fracción de fenilalanina. Este cambio simplificó la síntesis, pero no influyó en el resultado de la conjugación (p. ej., CL2-SN-38 y CL2A-SN-38 incorporaron ~ 6 SN-38 por molécula de IgG). En las comparaciones laterales no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la estabilidad en suero, unión al antígeno o citotoxicidad *in vitro* (no se muestra).

Para confirmar que el cambio en el enlazador SN-38 de CL2 a CL2A no afectaba a la fuerza *in vivo*, se compararon hRS7-CL2A y hRS7-CL2-SN-38 en ratones portadores de tumores COLO 205 o Capan-1 (no se muestra), utilizando 0,4 mg o 0,2 mg/kg de SN-38 dos veces a la semana durante 4 semanas, respectivamente, y con tumores iniciales de un tamaño de 0,25 cm<sup>3</sup> en ambos estudios. Ambos conjugados, hRS7-CL2A y CL2-SN-38, inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con los no tratados (ABC<sub>14 días</sub>  $P < 0,002$  frente a solución salina en el modelo COLO 205; ABC<sub>21 días</sub>  $P < 0,001$  frente a solución salina en el modelo Capan-1), y un ADC de control anti-CD20 inespecífico, hA20-CL2A-SN-38 (ABC<sub>14 días</sub>  $P < 0,003$  en el modelo COLO-205; ABC<sub>35 días</sub>  $P < 0,002$  en el modelo Capan-1). Al final del estudio (día 140) en el modelo Capan-1, el 50 % de los ratones tratados con hRS7-CL2A-SN-38 y el 40 % de los ratones tratados con hRS7-CL2-SN-38 estaban libres de tumores, mientras que solo el 20 % de los animales tratados con hA20-ADC no presentaban signos visibles de enfermedad. De manera significativa, no hubo diferencias en cuanto a la eficacia entre los 2 conjugados específicos en ambos modelos tumorales.

**Mecanismo de acción.** Los estudios de citotoxicidad *in vitro* demostraron que hRS7-CL2A-SN-38 tenía valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo de nmol/l frente a diversas líneas de tumores sólidos diferentes (Tabla 8). La CI<sub>50</sub> con SN-38 libre fue menor que el conjugado en todas las líneas celulares. Aunque no hubo correlación entre la expresión de TROP-2 y la sensibilidad a hRS7-CL2A-SN-38, la proporción de la CI<sub>50</sub> del ADC frente a SN-38 libre fue más baja en las células que expresaban TROP-2 a niveles más altos, reflejando más probablemente la mayor capacidad para internalizar el fármaco cuando hay más antígeno presente.

**Tabla 8. Expresión de TROP-2 y citotoxicidad *in vitro* de SN-38 y hRS7-SN-38 en diversas líneas de tumores sólidos**

Línea celular	Expresión de TROP-2 mediante FACS		Resultados de citotoxicidad				
	Fluorescencia media (fondo)	Porcentaje positivo	SN-38 CI <sub>50</sub> (nmol/l)	IC del 95 % CI <sub>50</sub> (nmol/l)	hRS7-SN-38 <sup>a</sup> CI <sub>50</sub> (nmol/l)	IC del 95 % CI <sub>50</sub> (nmol/l)	Proporción de ADC/SN-38 libre
Calu-3	282,2 (4,7)	99,6 %	7,19	5,77-8,95	9,97	8,12-12,25	1,39
COLO 205	141,5 (4,5)	99,5 %	1,02	0,66-1,571,95		1,26-3,011,91	
Capan-1	100,0 (5,0)	94,2 %	3,50	2,17-5,65	6,99	5,02-9,722,00	
PC-3	46,2 (5,5)	73,6 %	1,86	1,16-2,994,24		2,99-6,012,28	
SK-MES-1	44,0 (3,5)	91,2 %	8,61	6,30-11,76	23,14	17,98-29,78	2,69
BxPC-3	26,4 (3,1)	98,3 %	1,44	1,04-2,004,03		3,25-4,982,80	

<sup>a</sup>El valor de CI<sub>50</sub> se muestra como SN-38 equivalentes de hRS7-SN-38

Se sabe que SN-38 activa diversas rutas señalización en las células, lo que conduce a la apoptosis. Nuestros estudios iniciales examinaron *in vitro* la expresión de 2 proteínas implicadas en acontecimientos de señalización temprana (p21<sup>Waf1/Cip1</sup> y p53) y 1 acontecimiento apoptótico tardío [escisión de la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP)] (no se muestra). En BxPC-3, SN-38 condujo a aumentar 20 veces la expresión de p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, mientras que hRS7-CL2A-SN-38 produjo un aumento de solo 10 veces, un hallazgo consecuente con la mayor actividad de SN-38 libre en esta línea celular (Tabla 8). Sin embargo, hRS7-CL2A-SN-38 aumentó más de dos veces la expresión de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> en Calu-3 en comparación con SN-38 libre (no se muestra).

En la expresión de p53, se observó una mayor disparidad entre los acontecimientos de señalización mediados por hRS7-CL2A-SN-38 y SN-38 libre. Tanto en BxPC-3 como en Calu-3, la regulación positiva de p53 con SN-38 libre no fue evidente hasta las 48 horas, mientras que al cabo de 24 horas, hRS7-CL2A-SN-38 regulaba de manera positiva a p53 (no se muestra). Además, la expresión de p53 en células expuestas al ADC fue mayor en ambas líneas celulares en comparación con SN-38 (no se muestra). De manera interesante, aunque la IgG hRS7 no tuvo ningún efecto apreciable sobre la expresión de p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, indujo la regulación positiva de p53 tanto en BxPC-3 como en Calu-3, pero solo después de una exposición de 48 horas. En cuanto a acontecimientos apoptóticos tardíos, la escisión de la PARP fue evidente en ambas líneas celulares cuando se incubaron con SN-38 o con el conjugado (no se muestra). La presencia de la PARP (poli-ADP-ribosa polimerasa) escindida fue mayor a las 24 horas en BxPC-3, lo que se

correlaciona con una alta expresión de p21 y con su valor más bajo de  $Cl_{50}$ . El mayor grado de escisión con SN-38 libre sobre el ADC, fue consecuente con los hallazgos de citotoxicidad.

**Eficacia de hRS7-SN-38.** Dado que TROP-2 se expresa ampliamente en varios carcinomas humanos, se realizaron estudios en varios modelos diferentes de cáncer humano, que comenzaron con una evaluación del enlace de hRS7-CL2-SN-38, pero después, se utilizaron conjugados con el enlace de CL2A. Ratones lampiños portadores de Calu-3 que recibieron 0,04 mg de SN-38/kg del hRS7-CL2-SN-38 cada 4 días  $\times$  4, tuvieron una respuesta significativamente mejorada en comparación con la de los animales a los que se administró la cantidad equivalente de hLL2-CL2-SN-38 ( $VT = 0,14 \pm 0,22 \text{ cm}^3$  frente a  $0,80 \pm 0,91 \text{ cm}^3$ , respectivamente;  $ABC_{42\text{días}} P < 0,026$ ; **FIG. 5A**). Cuando la dosis se aumentó a 0,4 mg/kg de SN-38, se observó una respuesta a la dosis. A este nivel de dosis más alto, todos los ratones que recibieron el conjugado de hRS7 específico se "curaron" en 28 días y permanecieron sin tumores hasta el final del estudio el día 147, mientras que los tumores volvieron a crecer en los animales tratados con el ADC irrelevante ( $ABC_{98\text{días}}$  específica frente a irrelevante:  $P = 0,05$ ). En los ratones que recibieron la mezcla de IgG hRS7 y SN-38, los tumores avanzaron  $> 4,5$  veces al día 56 ( $VT = 1,10 \pm 0,88 \text{ cm}^3$ ;  $ABC_{56\text{días}} P < 0,006$  frente a hRS7-CL2-SN-38).

También se examinó la eficacia en xenoinjertos de tumores de colon (COLO 205) y de páncreas (Capan-1) humanos. En animales portadores de tumores COLO 205, (**FIG. 5B**), hRS7-CL2-SN-38 (0,4 mg/kg, c4dx8) impidió el crecimiento tumoral durante el período de tratamiento de 28 días con tumores significativamente más pequeños en comparación con el control de ADC anti-CD20 (hA20-CL2-SN-38) o IgG hRS7 ( $VT = 0,16 \pm 0,09 \text{ cm}^3$ ,  $1,19 \pm 0,59 \text{ cm}^3$  y  $1,77 \pm 0,93 \text{ cm}^3$ , respectivamente;  $ABC_{28\text{días}} P < 0,016$ ). La MTD de irinotecán (24 mg de SN-38/kg, c2dx5) fue tan eficaz como la de hRS7-CL2-SN-38, debido a que el suero de ratón puede convertir irinotecán en SN-38 de manera más eficaz que el suero humano, pero la dosis de SN-38 en irinotecán (2 400  $\mu\text{g}$  acumulados) fue 37,5 veces mayor que con el conjugado (64  $\mu\text{g}$  totales).

Los animales portadores de Capan-1 no mostraron ninguna respuesta significativa al irinotecán solo cuando recibieron una dosis de SN-38 equivalente a la del conjugado hRS7-CL2-SN-38 (p. ej., el día 35, el tamaño medio del tumor fue de  $0,04 \pm 0,05 \text{ cm}^3$  en los animales que recibieron 0,4 mg de SN-38/kg de hRS7-SN-38 frente a  $1,78 \pm 0,62 \text{ cm}^3$  en animales tratados con irinotecán que recibieron 0,4 mg/kg de SN-38;  $AUC_{\text{día}35} P < 0,001$ ; **FIG. 5C**). Cuando la dosis de irinotecán se aumentó 10 veces a 4 mg/kg de SN-38, la respuesta mejoró, aunque aún no fue tan significativa como la del conjugado al nivel de dosis de 0,4 mg/kg de SN-38 ( $VT = 0,17 \pm 0,18 \text{ cm}^3$  frente a  $1,69 \pm 0,47 \text{ cm}^3$ ,  $ABC_{\text{día}49} P < 0,001$ ). Una misma dosis de hA20-CL2-SN-38 inespecífico también tuvo un efecto antitumoral significativo en comparación con los animales tratados con irinotecán, pero el conjugado de hRS7 específico fue significativamente mejor que el ADC irrelevante ( $VT = 0,17 \pm 0,18 \text{ cm}^3$  frente a  $0,80 \pm 0,68 \text{ cm}^3$ ,  $ABC_{\text{día}49} P < 0,018$ ).

Los estudios con el ADC hRS7-CL2A-SN-38 se ampliaron luego a otros 2 modelos de cánceres epiteliales humanos. En ratones portadores de tumores pancreáticos humanos BxPC-3 (Figura 5D), hRS7-CL2A-SN-38 inhibió de nuevo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con los ratones de control tratados con solución salina o con una cantidad equivalente de hA20-CL2A-SN-38 inespecífico ( $VT = 0,24 \pm 0,11 \text{ cm}^3$  frente a  $1,17 \pm 0,45 \text{ cm}^3$  y  $1,05 \pm 0,73 \text{ cm}^3$ , respectivamente;  $ABC_{\text{día}21} P < 0,001$ ), o irinotecán suministrado a una dosis equivalente de SN-38 10 veces mayor ( $VT = 0,27 \pm 0,18 \text{ cm}^3$  frente a  $0,90 \pm 0,62 \text{ cm}^3$ , respectivamente;  $ABC_{\text{día}25} P < 0,004$ ). De manera interesante, en ratones portadores de tumores de pulmón de células escamosas humanas SK-MES-1 tratados con 0,4 mg/kg del ADC (**FIG. 5E**), la inhibición del crecimiento tumoral fue superior a la de los tratados con solución salina o IgG hRS7 no conjugado ( $VT = 0,36 \pm 0,25 \text{ cm}^3$  frente a  $1,02 \pm 0,70 \text{ cm}^3$  y  $1,30 \pm 1,08 \text{ cm}^3$ , respectivamente;  $AUC_{28\text{días}}, P < 0,043$ ), pero el hA20-CL2A-SN-38 inespecífico o la MTD de irinotecán proporcionaron los mismos efectos antitumorales que el conjugado hRS7-SN-38 específico. En todos los estudios murinos, el ADC hRS7-SN-38 se toleró bien en cuanto a pérdida de peso corporal (no se muestra).

**Biodistribución de hRS7-CL2A-SN-38.** Se compararon las biodistribuciones de hRS7-CL2A-SN-38 o de la IgG hRS7 no conjugada en ratones portadores de xenoinjertos de carcinoma de pulmón de células escamosas humanas SK-MES-1 (no se muestra), utilizando los sustratos respectivos marcados con  $^{111}\text{In}$ . Se realizó un análisis farmacocinético para determinar la eliminación de hRS7-CL2A-SN-38 en relación con hRS7 no conjugado (no se muestra). El ADC se eliminó más rápido que la cantidad equivalente de hRS7 no conjugado, mostrando el ADC una semivida y un tiempo de residencia medio  $\sim 40$  % más cortos. NO obstante, esto tuvo un impacto mínimo sobre la captación del tumor (no se muestra). Aunque hubo diferencias significativas en los puntos temporales de 24 y 48 horas, a las 72 horas (captación máxima), las cantidades de ambos agentes en el tumor eran similares. Entre los tejidos normales, las diferencias hepáticas y esplénicas fueron las más llamativas (no se muestra). Veinticuatro (24) horas después de la inyección, en el hígado había  $> 2$  veces más de hRS7-CL2A-SN-38 que de IgG hRS7. Por el contrario, en el bazo había 3 veces más de IgG hRS7 precursora presente en la captación máxima (punto temporal de 48 horas) que de hRS7-CL2A-SN-38. La captación y eliminación en el resto de los tejidos generalmente reflejan diferencias en la concentración sanguínea.

Dado que para la terapia se suministraron dosis dos veces a la semana, se examinó la captación del tumor en un grupo de animales que recibió primero una predosis de 0,2 mg/kg (250  $\mu\text{g}$  de proteína) del ADC hRS7 3 días antes de la inyección del anticuerpo marcado con  $^{111}\text{In}$ . La captación de tumor de  $^{111}\text{In}$ -hRS7-CL2A-SN-38 en ratones predosificados se redujo sustancialmente en cada punto temporal en comparación con la de los animales que no recibieron la predosis (p. ej., a las 72 horas, la captación del tumor predosificada fue de  $12,5 \pm 3,8 \%$  ID/g frente a  $25,4 \pm 8,1 \%$  ID/g en animales que no recibieron la predosis;  $P = 0,0123$ ). La predosificación no tuvo ningún impacto

apreciable sobre la eliminación sanguíneo o la captación tisular (no se muestra). Estos estudios sugieren que en algunos modelos de tumores, la acumulación tumoral del anticuerpo específico puede reducirse mediante la(s) dosis anterior(es), lo que probablemente explica por qué la especificidad de una respuesta terapéutica podría disminuir con el aumento de las dosis de ADC y por qué no está indicado un aumento adicional de la dosis.

5 Tolerabilidad de hRS7-CL2A-SN-38 en ratones Swiss-Webster y en monos cinomolgos. Los ratones Swiss-Webster toleraron 2 dosis durante 3 días, cada una de 4, 8 y 12 mg de SN-38/kg del hRS7-CL2A-SN-38, con una mínima pérdida de peso transitoria (no se muestra). No se produjo toxicidad hematopoyética y los análisis bioquímicos del suero solo revelaron aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa elevadas (no se muestra). Siete días después del tratamiento, la AST se elevó por encima de los niveles normales (>298 U/l) en los 3 grupos de tratamiento  
10 (no se muestra), con la mayor proporción de ratones en el grupo de 2 x 8 mg/kg. Sin embargo, 15 días después del tratamiento, la mayoría de los animales estaban dentro del intervalo normal. Los niveles de ALT también estuvieron por encima del intervalo normal (> 77 U/l) a los 7 días de tratamiento (no se muestra) y con indicios de normalización el día 15. Los hígados de todos estos ratones no mostraron indicios histológicos de daño tisular (no se muestra). En cuanto a la función renal, sólo los niveles de glucosa y cloruro estaban algo elevados en los grupos tratados. A 2 x  
15 8 mg/kg, 5 ratones de 7 tenían niveles de glucosa ligeramente elevados (intervalo de 273-320 mg/dl, límite superior de la normalidad 263 mg/dl) que volvió a la normalidad 15 días después de la inyección. De manera similar, los niveles de cloruro estaban ligeramente elevados, variando de 116 a 127 mmol/l (límite superior del intervalo de la normalidad 115 mmol/l) en los 2 grupos tratados con las dosis más altas (57 % en el grupo tratado con 2 x 8 mg/kg y 100 % de los ratones en el grupo tratado con 2 x 12mg/kg) y permanecieron elevados hasta 15 días después de la inyección.  
20 Esto también podría ser indicativo de toxicidad gastrointestinal, porque la mayor parte del cloruro se obtiene a través de la absorción intestinal; sin embargo, en el sacrificio, no hubo indicios histológicos de daño tisular en ningún sistema de órganos examinado (no se muestra).

Debido a que los ratones no expresan TROP-2 unido mediante hRS7, se necesitaba un modelo más adecuado para  
25 determinar el potencial del conjugado hRS7 para uso clínico. Los estudios de inmunohistología revelaron la unión en múltiples tejidos tanto en seres humanos como en monos cinomolgos (mama, ojo, tubo digestivo, riñón, pulmón, ovario, trompa de Falopio, páncreas, glándula paratiroidea, próstata, glándula salival, piel, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria y útero; no se muestra). Basándose en esta reactividad cruzada, se realizó un estudio de tolerabilidad en monos.

El grupo que recibió 2 x 0,96 mg de SN-38/kg de hRS7-CL2A-SN-38 no tuvo acontecimientos clínicos significativos  
30 después de la infusión y hasta la finalización del estudio. La pérdida de peso no superó el 7,3 % y volvió a los pesos de aclimatación al día 15. Se observaron disminuciones transitorias en la mayoría de los datos de los hemogramas (no se muestran), pero los valores no cayeron por debajo de los intervalos normales. En el análisis bioquímico del suero no se encontraron valores anómalos. La histopatología de los animales a los que se les realizó la necropsia el día 11 (8 días después de la última inyección) mostró cambios microscópicos en órganos hematopoyéticos (timo,  
35 ganglios linfáticos mandibulares y mesentéricos, bazo y médula ósea), órganos gastrointestinales (estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon y recto), órganos reproductores femeninos (ovarios, útero y vagina) y en el lugar de la inyección. Estos cambios variaron entre mínimos y moderados y se invirtieron por completo al final del período de recuperación (día 32) en todos los tejidos, excepto en el timo y el tubo digestivo, que tendían a recuperarse por completo en este último momento.

40 En el nivel de dosis de 2 x 1,92 mg de SN-38/kg del conjugado, hubo 1 muerte por complicaciones gastrointestinales y supresión de la médula ósea, y otros animales de este grupo mostraron acontecimientos adversos similares, pero más graves que el grupo de 2 x 0,96 mg/kg. Estos datos indican que las toxicidades limitantes de la dosis eran idénticas a las del irinotecán; concretamente, las toxicidades intestinales y hematológicas. Por tanto, la MTD de hRS7-CL2A-SN-38 se encuentra entre 2 x 0,96 y 1,92 mg de SN-38/kg, que representa una dosis equivalente humana de 2  
45 x 0,3 a 0,6 mg/kg de SN-38.

#### Análisis

TROP-2 es una proteína que se expresa en muchos tumores epiteliales, incluyendo cánceres de pulmón, mama, colorrectal, páncreas, próstata y ovario, lo que la convierte en una diana posiblemente importante para el suministro de agentes citotóxicos. El anticuerpo RS7 se internaliza cuando se une a TROP-2 (Shih *et al.*, 1995, Cancer Res 55:  
50 5857s-63s), lo que permite el suministro intracelular directa de productos citotóxicos.

La conjugación de fármacos quimioterapéuticos con anticuerpos se ha explorado durante más de 30 años. Dado que una parte sustancial de un ADC no es procesada por el tumor sino por los tejidos normales, existe el riesgo de que estos agentes sean demasiado tóxicos para los sistemas orgánicos normales antes de alcanzar el nivel terapéutico en los tumores. Como con cualquier agente terapéutico, la ventana terapéutica es un factor clave que determina el  
55 potencial de un ADC y, por tanto, en lugar de examinar fármacos "ultratóxicos", elegimos el SN-38 como el componente farmacológico del ADC dirigido a TROP-2.

SN-38 es un fuerte inhibidor de topoisomerasa I, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo nanomolar en varias líneas celulares. Es la forma activa del profármaco, irinotecán, que se utiliza para el tratamiento del cáncer colorrectal y que también tiene actividad en cánceres de pulmón, mama y cerebro. Se dedujo que un SN-38 directamente dirigido, en

forma de ADC, sería un tratamiento terapéutico significativamente mejorado con respecto al CPT-11, al superar la bioconversión baja y variable del paciente de este último a SN-38 activo.

El péptido Phe-Lys insertado en el derivado CL2 original permitió una posible escisión a través de la catepsina B. En un esfuerzo por simplificar el proceso sintético, en CL2A, se eliminó la fenilalanina y, por tanto, se eliminó el sitio de escisión de la catepsina B. De manera interesante, este producto tenía un perfil cromatográfico mejor definido en comparación con el perfil amplio obtenido con CL2 (no se muestra), pero lo que es más importante, este cambio no tuvo impacto sobre la unión, estabilidad o fuerza del conjugado en ensayos paralelos. Estos datos sugieren que SN-38 en CL2 se liberó del conjugado principalmente por la escisión en el enlace de carbonato de bencilo sensible al pH al anillo de lactona de SN-38 y no por el sitio de escisión de la catepsina B.

La citotoxicidad *in vitro* del ADC de hRS7 contra una serie de líneas celulares de tumores sólidos tenía sistemáticamente valores de  $CI_{50}$  en el intervalo de nmol/l. Sin embargo, las células expuestas a SN-38 libre manifestaron un valor de  $CI_{50}$  más bajo en comparación con el del ADC. Esta disparidad entre el SN-38 libre y el conjugado también se comunicó para ENZ-2208 (Sapra *et al.*, 2008, Clin Cancer Res 14: 1888-96) y NK012 (Koizumi *et al.*, 2006, Cancer Res 66: 10048-56). ENZ-2208 utiliza un PEG ramificado para unir aproximadamente de 3,5 a 4 moléculas de SN-38 por PEG, mientras que NK012 es una nanopartícula micelar que contiene 20 % de SN-38 en peso. Con nuestro ADC, esta disparidad (es decir, la proporción de fuerza con SN-38 libre frente a conjugado) disminuyó a medida que aumentaron los niveles de expresión de TROP-2 en las células tumorales, sugiriendo una ventaja para el suministro dirigido del fármaco. En cuanto a la estabilidad sérica *in vitro*, las formas CL2 y CL2A-SN-38 de hRS7-SN-38 produjeron una  $t_{1/2}$  de ~ 20 horas, lo que contrasta con la corta  $t_{1/2}$  de 12,3 minutos comunicada para ENZ-2208 (Zhao *et al.*, 2008, Bioconjug Chem 19: 849-59), pero similar a la liberación del 57 % de SN-38 de NK012 en condiciones fisiológicas después de 24 horas (Koizumi *et al.*, 2006, Cancer Res 66: 10048-56).

El tratamiento de ratones portadores de tumores con hRS7-SN-38 (ya sea con CL2-SN-38 o con CL2A-SN-38) inhibió significativamente el crecimiento tumoral en 5 modelos de tumores diferentes. En 4 de ellos, se observaron regresiones tumorales, y en el caso de Calu-3, todos los ratones que recibieron la dosis más alta de hRS7-SN-38 carecían de tumores al final del estudio. A diferencia de lo que ocurre en seres humanos, en los ratones, el irinotecán se convierte de manera muy eficaz en SN-38 a través de una esterasa plasmática, con una tasa de conversión superior al 50 % y produciendo una mayor eficacia en los ratones que en los seres humanos. Cuando se administró irinotecán a niveles 10 veces superiores o equivalentes de SN-38, hRS7-SN-38 fue significativamente mejor en el control del crecimiento tumoral. Solo cuando se administró irinotecán a su DMT de 24 mg/kg c2dx5 (37,5 veces más que SN-38), igualó la eficacia de hRS7-SN-38. En los pacientes, esperaríamos que esta ventaja favoreciera aún más al hRS7-CL2A-SN-38, porque la bioconversión del irinotecán sería sustancialmente menor.

También demostramos, en algunas líneas celulares que expresan antígenos, tal como SK-MES-1, que el uso de un ADC de unión a antígeno no garantiza mejores respuestas terapéuticas en comparación con un conjugado irrelevante, sin unión. Este hallazgo no es inusual o inesperado. De hecho, los conjugados SN-38 sin unión mencionados anteriormente mejoran la actividad terapéutica en comparación con irinotecán, por lo que se espera que un conjugado de IgG-SN-38 irrelevante tenga alguna actividad. Esto está relacionado con el hecho de que los tumores tienen vasos permeables e inmaduros, que permiten el paso de macromoléculas mejor que los tejidos normales. Con nuestro conjugado, el 50 % del SN-38 se liberará en ~13 horas cuando el pH disminuya a un nivel que imite los niveles lisosómicos (p. ej., pH de 5,3 a 37<sup>o</sup> C; datos no mostrados), mientras que al pH neutro del suero, la tasa de liberación se reduce casi al doble. Si un conjugado irrelevante entra en un microambiente tumoral ácido, se espera que libere algún SN-38 localmente. Otros factores, como la fisiología tumoral y las sensibilidades innatas al fármaco, también jugarán un papel en la definición de esta actividad "basal". Sin embargo, un conjugado específico con un tiempo de residencia más largo debería tener una fuerza mejorada sobre esta respuesta basal siempre que haya suficiente antígeno para capturar el anticuerpo específico. Los estudios de biodistribución en el modelo SK-MES-1 también mostraron que si el antígeno tumoral se satura como consecuencia de una dosificación sucesiva, se reduce la captación tumoral del conjugado específico, lo que produce resultados terapéuticos similares a los encontrados con un conjugado irrelevante.

Aunque es un desafío hacer comparaciones directas entre nuestro ADC y los informes publicados de otros agentes de suministro de SN-38, se pueden hacer algunas observaciones generales. En nuestros estudios de terapia, la dosis individual más alta fue de 0,4 mg/kg de SN-38. En el modelo Calu-3, sólo se suministraron 4 inyecciones para una dosis acumulada total de 1,6 mg/kg de SN-38 o de 32 µg de SN-38 en un ratón de 20 g. Se realizaron múltiples estudios con ENZ-2208 utilizando su MTD de 10 mg/kg × 5, y los estudios preclínicos con NK012 implicaron su MTD de 30 mg/kg × 3. Por tanto, se obtuvieron efectos antitumorales significativos con hRS7-SN-38 a 30 veces y 55 veces menos equivalentes de SN-38 que las dosis comunicadas en ENZ-2208 y NK012, respectivamente. Incluso con un ADC de hRS7 10 veces menor (0,04 mg/kg), se observaron efectos antitumorales significativos, mientras que no se presentaron dosis más bajas de ENZ-2208, y cuando la dosis de NK012 se redujo 4 veces a 7,5 mg/kg, la eficacia se perdió (Koizumi *et al.*, 2006, Cancer Res 66: 10048-56). Los ratones normales no mostraron toxicidad aguda con una dosis acumulada durante 1 semana de 24 mg/kg de SN-38 (1 500 mg/kg del conjugado), lo que indica que la MTD fue más alta. Por tanto, los animales portadores de tumores se trataron eficazmente con cantidades de SN-38 equivalentes de 7,5 a 15 veces más bajas.

Como inhibidor de topoisomerasa I, SN-38 induce un daño significativo al ADN de las células, con regulación positiva

de p53 y p21<sup>WAF1/Cip1</sup> dando como resultado la activación de la caspasa y la escisión de la PARP. Cuando las células BxPC-3 y Calu-3 se expusieron a nuestro ADC, tanto p53 como p21<sup>WAF1/Cip1</sup> se regularon de manera positiva por encima de los niveles basales. Además, la escisión de la PARP también fue evidente en ambas líneas celulares, confirmando un acontecimiento apoptótico en estas células. De interés fue la mayor regulación positiva de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> en BxPC-3 y Calu-3 en relación con p53 tanto por SN-38 libre como por nuestro hRS7-SN-38. Esto puede ser indicativo del estado mutacional de p53 en estas 2 líneas celulares y del uso de una ruta independiente de p53 para la apoptosis mediada por p21<sup>WAF1/Cip1</sup>.

Una observación interesante fue la regulación positiva temprana de p53 tanto en BxPC-3 como en Calu-3 a las 24 horas, mediada por el ADC hRS7 en relación con SN-38 libre. Incluso la IgG hRS7 desnuda podría regular de manera positiva a p53 en estas líneas celulares, aunque solo después de una exposición de 48 horas. La sobreexpresión de TROP-2 y el entrecruzamiento con anticuerpos se ha relacionado con diversos acontecimientos de señalización relacionados con MAPK, así como con la liberación de calcio intracelular. Aunque la unión de hRS7 no fue suficiente para inducir la apoptosis en BxPC-3 y Calu-3, como es evidente debido a la ausencia de escisión de la PARP, puede ser suficiente para sensibilizar una célula, de manera que la inclusión de SN-38 conjugado con hRS7 puede conducir a un mayor efecto sobre la inhibición del crecimiento tumoral. Actualmente se están realizando estudios para comprender qué rutas están implicadas en el suministro de hRS7 de SN-38 y cómo pueden diferir del SN-38 libre, y qué efecto puede tener el estado de p53 en esta señalización.

Los estudios de biodistribución revelaron que hRS7-CL2A-SN-38 tenía una captación tumoral similar a la de la IgG hRS7 precursora, pero se elimina sustancialmente más rápido con una captación hepática 2 veces mayor, lo que puede deberse a la hidrofobicidad de SN-38. Con el ADC eliminándose a través del hígado, se esperaba que las toxicidades hepáticas y gastrointestinales fuesen limitantes de la dosis. Aunque los ratones mostraban indicios de aumento de las transaminasas hepáticas, la toxicidad gastrointestinal fue leve en el mejor de los casos, con sólo una pérdida transitoria de peso y no se observaron anomalías en el examen histopatológico. De manera interesante, no se observó toxicidad hematológica. Sin embargo, los monos mostraron un perfil de toxicidad idéntico al esperado para el irinotecán, siendo la toxicidad gastrointestinal y hematológica limitante de la dosis.

Debido a que TROP-2 reconocido por hRS7 no se expresa en ratones, fue de vital importancia realizar estudios de toxicidad en monos que tenían una expresión tisular de TROP-2 similar a la de los seres humanos. Los monos toleraron 0,96 mg/kg/dosis (~12 mg/m<sup>2</sup>) con toxicidad leve y reversible, que se extrapola a una dosis humana de ~0,3 mg/kg/dosis (~11 mg/m<sup>2</sup>). En un ensayo clínico en Fase I de NK012, los pacientes con tumores sólidos toleraron 28 mg/m<sup>2</sup> de SN-38 cada 3 semanas con neutropenia de Grado 4 como toxicidad limitante de la dosis (Hamaguchi *et al.*, 2010, Clin Cancer Res 16:5058-66). De manera similar, los ensayos clínicos en Fase I con ENZ-2208 revelaron neutropenia febril limitante de la dosis, con la recomendación de administrar 10 mg/m<sup>2</sup> cada 3 semanas o 16 mg/m<sup>2</sup> si los pacientes recibieron G-CSF. Dado que los monos toleraron una dosis equivalente humana acumulada de 22 mg/m<sup>2</sup>, es posible que, aunque hRS7 se una a diversos tejidos normales, la MTD para un solo tratamiento del ADC de hRS7 podría ser similar a la de otros agentes SN-38 inespecíficos. De hecho, la especificidad del anticuerpo anti-TROP-2 no pareció desempeñar un papel en la definición de la DLT, porque el perfil de toxicidad era similar al del irinotecán. Lo que es más importante, si se puede lograr actividad antitumoral en seres humanos como en ratones que respondieron con una dosis equivalente humana de solo 0,03 mg de SN-38 equivalentes/kg/dosis, entonces podrían realizarse respuestas antitumorales clínicamente significativas.

En conclusión, estudios de toxicología en monos, combinados con modelos de xenoinjerto de cáncer humano *in vivo* en ratones, han indicado que este ADC que se dirige a TROP-2 es un agente terapéutico eficaz en varios tumores de diferente origen epitelial.

#### **Ejemplo 5. Anti-CD22 (Epratuzumab) conjugado con SN-38 para la terapia de neoplasias malignas hematológicas**

Anteriormente se descubrió que los anticuerpos de internalización lenta conjugados con SN-38 podrían utilizarse satisfactoriamente cuando se preparan con un enlazador CL2A que permite que aproximadamente el 50 % del SN-38 unido a IgG se disocie en suero cada 24 horas. En este estudio, la eficacia de los conjugados SN-38 preparados con epratuzumab (internalización rápida) y veltuzumab (internalización lenta), IgG anti-CD22 y anti-CD20 humanizada, respectivamente, se examinó para el tratamiento de neoplasias malignas de células B. Ambos conjugados de anticuerpo-fármaco tenían una actividad nanomolar similar contra una variedad de líneas celulares de linfoma/leucemia humana, pero la liberación lenta de SN-38 comprometió la discriminación de la fuerza *in vitro* incluso contra un conjugado irrelevante. Cuando SN-38 se unió de manera estable con el conjugado anti-CD22, su fuerza se redujo de 40 a 55 veces. Por lo tanto, se realizaron estudios adicionales solo con el enlazador CL2A menos estable y de lenta disociación. Se descubrió una actividad antitumoral similar *in vivo* entre el conjugado de anticuerpo-fármaco CD22 y CD20 en ratones portadores de xenoinjertos Ramos, a pesar de que Ramos expresó 15 veces más CD20 que CD22, lo que sugería que la internalización del conjugado de epratuzumab-SN-38 (Emab-SN-38) mejoró su actividad. Emab-SN-38 fue más eficaz que un conjugado de IgG-SN-38 irrelevante, de no unión, *in vivo*, eliminando una gran cantidad de xenoinjertos de Ramos bien establecidos en dosis no tóxicas. Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que Emab-CL2A-SN-38 podría combinarse con veltuzumab no conjugado para un tratamiento más eficaz. Por tanto, Emab-SN-38 es activo en linfoma y leucemia en dosis muy por debajo de los niveles tóxicos y, por lo tanto, representa un nuevo agente prometedor con potencial terapéutico solo o combinado con terapia de anticuerpos anti-CD20. (Sharkey

*et al.*, 2011, *Mol Cancer Ther* 11:224-34.)

### Introducción

Un esfuerzo significativo se ha centrado en la terapia biológica de la leucemia y el linfoma, donde anticuerpos no conjugados (p. ej., rituximab, alemtuzumab, ofatumumab), radioinmunoconjugados ( $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab tiuxetan,  $^{131}\text{I}$ -tositumomab) y un fármaco conjugado (gemtuzumab ozogamicina), recibieron la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos. Otro conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), brentuximab vedotin (SGN-35; anti-CD30-auristatina E), recibió recientemente la aprobación acelerada de la FDA para el linfoma de Hodgkin y los linfomas anaplásicos de células grandes. También hay diversos ADC distintos en desarrollo preclínico y clínico que se dirigen a CD19, CD22, CD37, CD74 y CD79b.

Los anticuerpos contra todas estas dianas son opciones lógicas para los transportadores de fármacos, porque se están internalizando. La internalización y la especificidad de CD22 lo han convertido en una diana particularmente importante para la leucemia y los linfomas, con al menos 3 conjugados anti-CD22 diferentes en investigación clínica, incluyendo CMC-544 (caliqueamicina conjugada con ácido lábil), un conjugado anti-CD22-maitansina (MCC-DM1 unido de forma estable) y CAT-3888 (oficialmente BL22; una proteína de fusión monocatenaria de exotoxina de *Pseudomonas*). El agente activo en todos estos conjugados tiene una fuerza subnanomolar (es decir, los llamados ultratóxicos).

Recientemente desarrollamos métodos para conjugar anticuerpos con SN-38, un inhibidor de topoisomerasa I con baja fuerza nanomolar que procede del profármaco, irinotecán (Govindan *et al.*, 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-62; Moon *et al.*, 2008, *J Med Chem* 51:6916-26). Inicialmente se examinaron cuatro características químicas de enlace SN-38 utilizando conjugados preparados con un anticuerpo anti-CEACAM5 de internalización lenta (Govindan *et al.*, 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-62; Moon *et al.*, 2008, *J Med Chem* 51:6916-26). Los conjugados conservaron la unión de CEACAM5 pero difirieron en la tasa de disociación de SN-38 en suero humano, con semividas que varían de aproximadamente 10 a 67 horas (Govindan *et al.*, 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-62). Por último, el enlazador denominado CL2, con estabilidad intermedia (- 50 % disociado en 24-35 horas), se seleccionó para su posterior desarrollo. CL2 se modificó recientemente, eliminando la fenilalanina en el dipéptido escindible con catepsina B para simplificar y mejorar los rendimientos de fabricación. El nuevo derivado, denominado CL2A, conserva el enlace de carbonato, sensible al pH, con SN-38, pero la catepsina B ya no lo escinde selectivamente. No obstante, tiene la misma estabilidad en suero y actividad *in vivo* que la del enlazador CL2 original (Cardillo *et al.*, 2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69). Dado que se descubrió una eficacia significativa sin toxicidad con el anti-CEACAM5-SN-38 de internalización lenta, se postuló que su actividad estaba favorecida por la liberación lenta de SN-38 del anticuerpo después de localizarse en un tumor. Por tanto, el objetivo principal de este informe fue evaluar las posibilidades terapéuticas de los conjugados preparados utilizando el enlazador CL2A con dos anticuerpos que son sumamente específicos para los cánceres de células B pero que difieren en cuanto a sus propiedades de expresión antigénica e internalización.

Epratuzumab (Emab) es una IgG1 anti-CD22 humanizada de internalización rápida (p. ej.,  $\geq 50\%$  en 1 hora) que se ha evaluado ampliamente en el linfoma y la leucemia en una forma no conjugada o conjugada. Veltuzumab (Vmab) es un anticuerpo anti-CD20 humanizado que también se está estudiando clínicamente pero que se internaliza lentamente (p. ej.,  $\sim 10\%$  en 1 hora). CD20 generalmente se expresa a niveles mucho más altos que CD22 en el linfoma no Hodgkin, mientras que CD22 se expresa preferencialmente en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pero no en el mieloma múltiple. Ambos anticuerpos son eficaces en pacientes como agentes no conjugados, pero solo veltuzumab es activo en modelos de xenoinjerto murino (Stein *et al.*, 2004, *Clin Cancer Res* 10:2868-76). Basándose en estudios previos que mostraron que  $^{90}\text{Y}$ -Emab combinado con veltuzumab no conjugado tenía mayor eficacia en modelos de LNH (Mattes *et al.*, 2008, *Clin Cancer Res* 14: 6154-60), también se examinó la combinación de Emab-SN-38 + Vmab, ya que esto podría proporcionar un beneficio adicional sin competir por el mismo antígeno diana o sin tener toxicidad adicional.

### Materiales y Métodos

Líneas celulares. Ramos, Raji, Daudi (linfomas de Burkitt) y JeKo-1 (linfoma de células del manto) se adquirieron en la American Type Culture Collection. REH, RS4;11, MN-60 y 697 (LLA) se adquirieron en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. WSU-FSCCL (LNH folicular) fue un obsequio del Dr. Mitchell R. Smith (Fox Chase Cancer Center, Filadelfia, PA). Todas las líneas celulares se cultivaron en una incubadora humidificada con  $\text{CO}_2$  (5 %) a  $37^\circ\text{C}$  en medios complementados recomendados que contenían entre un 10 % y un 20 % de suero bovino fetal y se comprobaron periódicamente para detectar micoplasmas.

Anticuerpos y métodos de conjugación. Epratuzumab y veltuzumab son anticuerpos monoclonales de IgG1 anti-CD22 y anti-CD20 humanizados, respectivamente. Labetuzumab (Lmab), una IgG1 anti-CEACAM5 humanizada y RS7, un anticuerpo anti-TROP-2 humanizado (ambos de Immunomedics, Inc.), se utilizaron como controles irrelevantes de no unión. En la presente memoria, Emab-SN-38, Vmab-SN-38 y Lmab-SN-38, se refieren a conjugados preparados utilizando el enlazador CL2A descrito anteriormente. Estudios *in vitro* realizados en suero humano mostraron que aproximadamente un 50 % de la fracción SN-38 activa se libera de la IgG cada día (Cardillo *et al.*, 2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69). Otro enlazador, denominado CL2E (véanse las patentes de Estados Unidos N.º 7.999.083 y

8.080.250), es estable en suero humano durante 14 días, pero contiene un sitio de escisión de cathepsina B para facilitar la liberación de SN-38 cuando se procesa en lisosomas. El método para preparar CL2E y las estructuras de los enlazadores CL2A y CL2E se proporcionan en las Patentes de Estados Unidos N.º 7.999.083 y 8.080.250. Los conjugados contenían aproximadamente 6 unidades de SN-38 por IgG (p. ej., 1,0 mg del conjugado IgG-SN-38 contiene ~ 16 µg de SN-38).

Unión celular y citotoxicidad *in vitro*. Utilizando los anticuerpos específicos e irrelevantes no conjugados incubados durante 1 hora a 4º C, se realizó citometría de flujo, revelándose la unión utilizando anti IgG humana de cabra específica del fragmento Fcy marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch), que también se incubó durante 1 hora a 4º C. La fluorescencia media se determinó en un citómetro de flujo FACSCALIBUR® (Becton Dickinson) utilizando un programa informático CellQuest.

La citotoxicidad se determinó utilizando el ensayo de reducción con colorante MTS (Promega). Se generaron curvas de respuesta a la dosis [con/sin anti F(ab')<sub>2</sub> Fcy humano de cabra; Jackson ImmunoResearch] a partir de la media de determinaciones por triplicado, y los valores de CI<sub>50</sub> se calcularon utilizando el programa informático GraphPad PRISM® (v5), con comparaciones estadísticas utilizando una prueba F en las curvas de mejor ajuste para los datos. La significancia se estableció a una P <0,05.

Inmunotransferencia. Después de 24 o 48 horas de exposición a los agentes de ensayo, los marcadores de apoptosis temprana (expresión de p21) y tardía (escisión de PARP) se revelaron mediante transferencia Western.

Estudios *in vivo*. El modelo de Ramos subcutáneo se inició implantando 1 × 10<sup>7</sup> células (0,2 ml) de cultivo (viabilidad > 95 %) en ratonas lampiñas de 4 a 6 semanas de vida (Taconic). A las tres semanas de la implantación, los animales con tumores que variaban entre 0,4 y 0,8 cm<sup>3</sup> (medidos con un calibrador, L × W × D) se separaron en grupos de animales, cada uno de ellos con el mismo intervalo de tamaños de tumor. El tamaño del tumor y el peso corporal se midieron al menos una vez a la semana, retirándose los animales del estudio cuando los tumores crecieron hasta alcanzar 3,0 cm<sup>3</sup> o si experimentaban una pérdida de peso corporal del 20 % o mayor. Los modelos WSU-FSCCL y 697 intravenosos se iniciaron mediante inyección intravenosa de 2,5 × 10<sup>6</sup> y 1 × 10<sup>7</sup> células, respectivamente, en ratonas con inmunodeficiencia combinada grave (SCID, siglas del inglés *severe combined immunodeficiency*) (Taconic). El tratamiento comenzó 5 días después de la administración de las células WSU-FSCCL y 7 días después de la inoculación de 697. Se observó a los animales diariamente, utilizando la parálisis de las patas traseras u otros signos de morbilidad como criterios indirectos de valoración de supervivencia. Todos los tratamientos se suministraron por vía intraperitoneal en ≤0,2 ml. En el apartado de Resultados se proporcionan las dosis específicas y la frecuencia. Debido a que los ratones convierten el irinotecán en SN-38 de manera eficaz, la dosificación de irinotecán se ajustó basándose en equivalentes de SN-38; Los equivalentes molares de SN-38 se basan en el 1,6 % de la masa de ADC y el 60 % de la masa de irinotecán.

La eficacia se expresó en una curva de Kaplan-Meier, utilizando el tiempo transcurrido hasta la progresión (TTP) como criterios indirectos de valoración de supervivencia, como se indicó anteriormente. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de orden logarítmico utilizando el programa informático GraphPad PRISM® (significación, P <0,05).

### Resultados

Expresión de antígenos y citotoxicidad *in vitro*. Todas las líneas celulares fueron sumamente susceptibles a SN-38, con valores de CE<sub>50</sub> que van desde 0,13 nmol/l para Daudi a 2,28 nmol/l para RS4;11 (Tabla 9). Excepto para 697 y RS4;11, el conjugado Emab-SN-38 anti-CD22 fue de 2 a 7 veces menos eficaz que SN-38. Este es un hallazgo común con nuestros conjugados específicos, así como con otros conjugados de SN-38 inespecíficos. A pesar de las diferencias en la expresión de antígenos, el Emab-CL2A-SN-38 y el Vmab-CL2A-SN-38 tenían fuerzas similares a las de conjugado Lmab-CL2A-SN-38 anti-CEACAM5 de no unión, lo que probablemente se debió a la disociación de aproximadamente el 90 % de SN-38 durante el ensayo con MTS de 4 días. Otros procedimientos *in vitro* que utilizan tiempos de exposición más cortos también fueron ineficaces para discriminar diferencias en las fuerzas de los conjugados. Por ejemplo, la tinción con anexina V después de una exposición de 1 día no logró encontrar diferencias entre las células tratadas y no tratadas (no se muestra). La regulación positiva de p21 y la escisión de la PARP, también se examinaron como marcadores temprano y tardío de la apoptosis, respectivamente. Ramos no expresó p21. Sin embargo, se detectó escisión de la PARP, pero solo después de una exposición de 48 horas, expresándose con más fuerza en células tratadas con SN-38 (no se muestra). La línea celular WSU-FSCCL expresó p21, pero ni la regulación positiva de p21 ni la escisión de la PARP fueron evidentes hasta 48 horas después de la exposición a Emab-CL2A-SN-38. Sin embargo, ambas se observaron después de una exposición de 24 horas con SN-38 libre (no se muestra). Mientras que la intensidad mejorada y la activación más temprana de los acontecimientos apoptóticos con SN-38 libre son consecuentes con su CE<sub>50</sub> más baja sobre la forma conjugada de la IgG, los resultados indicaron que se requeriría un período de exposición de al menos 48 horas, pero en este momento, aproximadamente el 75 % del SN-38 se liberaría del conjugado.

**Tabla 9.** Expresión de CD20 y CD22 por FACSscan y citotoxicidad *in vitro* mediante ensayo con MTS de SN-38 y conjugados específicos de Emab anti-CD22-SN-38, Vmab anti-CD20-SN-38 y Lmab anti-CEACAM5-SN-38 contra varias líneas celulares tumorales hematopoyéticas

	Expresión de CD20 Fluorescencia de la línea celular media (fondo)	Expresión de CD22 Fluorescencia media (fondo)	SN-38, nmol/l	<sup>a</sup> Valores de CE <sub>50</sub>								
				IC del 95 %	Emab-SN- 38, nmol/l	IC del 95 %	Vmab-SN- 38, nmol/l	IC del 95 %	Lmab-SN- 38, nmol/l	IC del 95 %		
LNH: Burkitt												
Raji	422,2 (6,8)	45,9 (6,8)	1,42	0,8-2,4	2,10	1,2-3,8	ND	-	ND	-	-	-
Ramos	620,4 (4,1)	40,8 (4,1)	0,40	0,2-0,7	2,92	1,6-5,4	ND	-	ND	-	-	1,8-7,6
Daudi	815,1 (5,9)	145,0 (5,9)	0,13	0,1-0,2	9,84	4,5-21,6	13,56	4,9-37,2	8,08	2,9-22,2	-	-
LNH: folicular												
FSCCL	97,4 (4,9)	7,7 (4,9)	0,50	0,3-1,0	0,68	0,4-1,1	ND	-	-	-	-	-
LNH: células del manto												
Jeko-1	604,6 (6,5)	11,2 (6,5)	ND	-	2,25	1,3-3,8	1,98	1,1-3,5	2,27	1,3-3,9	-	-
LLA células B												
REH	12,3 (4,1)	22,9 (4,1)	0,47	0,3-0,9	1,22	0,8-1,9	ND	-	ND	-	-	-
697	6,9 (4,2)	16,0 (4,2)	2,23	1,3-3,9	2,67	1,7-3,7	ND	-	ND	-	-	-
RS4;11	3,7 (4,1)	23,3 (4,1)	2,28	1,1-4,9	1,68	1,0-3,0	ND	-	ND	-	-	-
MN-60	21,5 (5,8)	10,3 (5,8)	1,23	0,6-2,1	3,65	2,2-6,2	ND	-	ND	-	-	-

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; NR, no determinado. <sup>a</sup>EC<sub>50</sub> expresada como equivalentes molares de SN-38 en Emab-SN-38.

De nuevo examinamos la escisión de la PARP y la expresión de p21, esta vez en células tratadas con Emab-CL2A-SN-38 + Vmab. Confirmando el estudio anterior en Ramos, la escisión de la PARP se produce primero solo después de una exposición de 48 horas al conjugado, con expresión sin cambios en presencia de un anticuerpo de entrecruzamiento (no se muestra). La exposición a veltuzumab durante más de 48 horas no tuvo ningún efecto sobre la escisión de la PARP, pero la escisión fue fuerte en 24 horas cuando se añadió un anticuerpo de entrecruzamiento (no se muestra). Sin embargo, cuando se combinó veltuzumab solo (sin entrecruzamiento) con Emab-CL2A-SN-38, la escisión de la PARP se produjo después de una exposición de 24 horas (no se muestra), lo que indica que veltuzumab podría inducir un inicio más rápido de apoptosis, incluso sin entrecruzamiento. La única diferencia notable en la línea celular WSU-FSCCL fue que la combinación mejoró en gran medida la expresión de p21 a las 48 horas (no se muestra), nuevamente sugiriendo una aceleración de la inducción de la apoptosis cuando veltuzumab se combina con el conjugado Emab-CL2A-SN-38. El retraso en la inducción de la apoptosis en WSU-FSCCL en comparación con Ramos probablemente se explica por la menor expresión de CD22 y CD20.

Los agentes ultratóxicos suelen utilizar enlazadores que son muy estables en suero, ya que su liberación prematura aumentaría la toxicidad, pero estos conjugados deben internalizarse para que el fármaco se suministre de manera óptima. Dado que epratuzumab se internaliza rápidamente, examinamos si podría beneficiarse de un SN-38 unido de manera más estable, comparando la citotoxicidad *in vitro* del conjugado Emab-SN-38 unido a CL2A con el conjugado CL2E-SN-38 estable en suero. Ambos conjugados tenían una afinidad de unión similar (no se muestra), pero el Emab-CL2E-SN-38 más estable fue aproximadamente de 40 a 55 veces menos fuerte que el conjugado CL2A en 3 líneas celulares (no se muestra). Aunque faltaba especificidad con los conjugados CL2A, el Emab-CL2E-SN-38 fue sistemáticamente aproximadamente dos veces más fuerte que el conjugado Lmab-anti-CEACAM5-CL2E-SN-38 de no unión (no se muestra). Llegamos a la conclusión de que era poco probable que el conjugado unido de forma más estable fuera apropiado para un conjugado de veltuzumab de internalización lenta y, por lo tanto, continuamos nuestra investigación solo con conjugados SN-38 unidos a CL2A.

Debido a las limitaciones de los ensayos *in vitro*, la eficacia se evaluó en modelos de xenoinjerto. Como se indica en la Tabla 9, todas las líneas celulares de linfoma tienen una expresión mucho más alta de CD20 que de CD22. Daudi tuvo la expresión más alta de CD22 y CD20, pero es muy sensible *in vivo* a veltuzumab no conjugado y ensayos *in vitro* revelaron la mayor sensibilidad a SN-38 (Tabla 9). Es probable que estas propiedades dificulten la evaluación de las diferencias en la actividad atribuidas al conjugado SN-38 frente al anticuerpo no conjugado, particularmente cuando el epratuzumab no conjugado no es un tratamiento eficaz en animales. Dado que anteriormente se había utilizado la línea Ramos para mostrar una ventaja al combinar <sup>90</sup>Y-Emab con veltuzumab (Mattes *et al.*, 2008, Clin Cancer Res 14: 6154-60), elegimos comenzar con una comparación de los conjugados Emab-CL2A-SN-38 y Vmab-CL2A-SN-38 en la línea celular Burkitt humana Ramos. A pesar de que la citometría de flujo muestra una expresión 15 veces mayor de CD20 sobre CD22, la inmunohistología de los xenoinjertos de Ramos mostró abundancia de CD22 y CD20, expresándose CD22 aparentemente de manera más uniforme que CD20 (no se muestra).

Los xenoinjertos de Ramos en animales no tratados avanzaron rápidamente, alcanzando el tamaño final de 3,0 cm<sup>3</sup> desde su tamaño inicial de 0,4 cm<sup>3</sup> a los 6 días (no se muestra), y como se informó anteriormente, ni veltuzumab ni epratuzumab afectaron apreciablemente a la progresión de xenoinjertos de Ramos bien establecidos (Sharkey *et al.*, 2009, J Nucl Med 50:444-53). En consonancia con hallazgos anteriores utilizando otros conjugados de SN-38, ninguno de los animales tratados con un régimen de tratamiento de 4 semanas, dos veces a la semana, de 0,5 mg/dosis, tuvo una pérdida de peso apreciable. Ambos conjugados fueron sumamente eficaces para controlar el crecimiento tumoral, con un 80 % o más de los animales sin indicios de tumor al final del tratamiento de 4 semanas (FIG. 6). La dosis de 0,25 mg de Vmab-CL2A-SN-38 fue mejor para controlar el crecimiento durante las 4 primeras semanas, pero a 0,5 mg, se observó un control de crecimiento temprano similar para ambos conjugados. Por tanto, a pesar de una expresión 15 veces mayor de CD20 que de CD22, Emab-CL2A-SN-38 se comparó favorablemente con Vmab-CL2A-SN-38. Por lo tanto, los estudios restantes se centraron en Emab-S CL2A-N-38 solo o en combinación con veltuzumab no conjugado.

Respuesta a la dosis y especificidad de Emab-CL2A-SN-38. Se observó una relación de respuesta a la dosis de los conjugados específicos Emab-CL2A-SN-38 y Lmab-CL2A-SN-38 irrelevantes, pero Emab-CL2A-SN-38 tuvo un control del crecimiento significativamente mejor en 2 de los 3 niveles analizados, y con una fuerte tendencia a favor del conjugado específico a la dosis intermedia (FIG. 7). Nuevamente, 0,25 mg de Emab-CL2A-SN-38 extirparon la mayoría de los tumores; en esta ocasión, 7 de 10 animales carecían de tumores al final del período de seguimiento de 12 semanas, sin cambios en el peso corporal. Los animales que recibieron irinotecán solo (6,5 µg/dosis; aproximadamente los mismos equivalentes de SN-38 que 0,25 mg de conjugado) tuvieron una mediana de supervivencia de 1,9 semanas, sin tumores 3 de 11 animales al final del estudio, que no fue significativamente diferente de la mediana de supervivencia de 3,45 semanas para el conjugado irrelevante Lmab-CL2A-SN-38 (P = 0,452; FIG. 7C).

En el modelo 697 de leucemia diseminada, la mediana de supervivencia de los animales tratados con solución salina fue de tan solo 17 días desde la inoculación del tumor. Los animales que recibieron epratuzumab no conjugado e irinotecán (los mismos equivalentes molares de SN-38 que 0,5 mg del conjugado) tuvieron la misma mediana de supervivencia, mientras que los animales que recibieron 0,5 mg de Emab-CL2A-SN-38 dos veces por semana a partir de los 7 días de la inoculación del tumor sobrevivieron hasta los 24,5 días, significativamente más tiempo que los animales no tratados (P < 0,0001) o para epratuzumab no conjugado administrado con irinotecán (P = 0,016). Sin embargo, Emab-CL2A-SN-38 no fue significativamente mejor que el conjugado irrelevante (mediana de supervivencia

= 22 días;  $P = 0,304$ ), lo que probablemente refleja la baja expresión de CD22 en esta línea celular.

Emab-CL2A-SN-38 combinado con Vmab anti-CD20 no conjugado. Anteriormente se comunicaron mejores respuestas cuando  $^{90}\text{Y}$ -Emab se combinó con veltuzumab no conjugado en el modelo de Ramos subcutáneo (Mattes *et al.*, 2008, Clin Cancer Res 14: 6154-60) y, por tanto, esta posibilidad se examinó con Emab-CL2A-SN-38. En un estudio piloto, 5 animales portadores de tumores Ramos subcutáneos con un promedio de aproximadamente  $0,3 \text{ cm}^3$  recibieron veltuzumab (0,1 mg), 0,1 mg de Emab-CL2A-SN-38 o Emab-CL2A-SN-38 + Vmab (todos los agentes se administran dos veces por semana durante 4 semanas). La mediana del TTP hasta alcanzar  $2,0 \text{ cm}^3$  fue de 22, 14 y más de 77 días, respectivamente (veltuzumab frente a Emab-CL2A-SN-38 solo,  $P = 0,59$ ; Emab-CL2A-SN-38 + Vmab frente a Emab-CL2A-SN-38,  $P = 0,0145$ ), proporcionando una indicación inicial de que la combinación de veltuzumab con Emab-CL2A-SN-38 mejoró la respuesta terapéutica global. En un estudio de seguimiento en el que también utilizó un régimen de tratamiento de 4 semanas dos veces por semana, 6 de 11 animales que recibieron 0,1 mg de Emab-CL2A-SN-38 y 0,1 mg de veltuzumab, no mostraron indicios de tumores 16 semanas después de iniciar el tratamiento, mientras que la mediana de supervivencia de los animales que recibieron veltuzumab solo o con 0,1 mg del Lmab-CL2A-SN-38 de control fue de 1,9 y 3,3 semanas, respectivamente, con 3 de 11 animales sin tumores a las 16 semanas en cada uno de estos grupos (no se muestra). A pesar de que la mediana del TTP era más larga y de que había más supervivientes, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Por tanto, en el modelo de Ramos, que tiene niveles de CD20 abundantes y niveles moderados de CD22, el conjugado Emab-CL2A-SN-38 suministrado a niveles de dosis no tóxicos, no fue significativamente mejor que la terapia con anti-CD20 no conjugado, pero la adición de Emab-CL2A-SN-38 a la terapia con anti-CD20 no conjugado pareció mejorar la respuesta sin toxicidad. Es importante destacar que los conjugados de SN-38 se suministran a niveles mucho menores que su dosis máxima tolerada y, por lo tanto, estos resultados no deben interpretarse como que la terapia con anti-CD20 no conjugado es igual a la del Emab-CL2A-SN-38 conjugado.

Se realizaron dos estudios adicionales en un modelo implantado por vía intravenosa utilizando la línea celular de LNH folicular WSU-FSCCL que tiene una baja expresión de CD20 y CD22 (no se muestra). El tiempo de la mediana de supervivencia de los animales tratados con solución salina fue de 40 a 42 días desde la implantación del tumor. Irinotecán solo (no se muestra), administrado en una dosis que contiene los mismos equivalentes de SN-38 que 0,3 mg de ADC, aumentó la mediana de supervivencia (49 frente a 40 días, respectivamente;  $P = 0,042$ ), pero 14 de 15 animales sucumbieron a la progresión de la enfermedad el día 49, el mismo día se eliminaron los últimos 4 de los 15 animales del grupo tratado con solución salina (no se muestra). A pesar de su expresión de relativamente baja de CD20, veltuzumab solo (35  $\mu\text{g}$  dos veces por semana  $\times$  4 semanas) fue eficaz en este modelo. La mediana de supervivencia aumentó a 91 días en el primer estudio, con 2 recuperaciones (día 161), y a 77 días en el segundo, pero sin supervivientes después de 89 días (veltuzumab solo frente a los tratados con solución salina,  $P < 0,001$  en ambos estudios). Epratuzumab no conjugado (0,3 mg/dosis) combinado con irinotecán y veltuzumab tuvo la misma mediana de supervivencia que veltuzumab solo, sugiriendo que ni epratuzumab ni irinotecán contribuyeron a la respuesta neta.

Como se esperaba debido a la baja expresión de CD22 por WSU-FSCCL, Emab-CL2A-SN-38 solo no fue tan eficaz como en Ramos. A la dosis de 0,15 mg, no se observó ningún beneficio significativo sobre el grupo tratado con solución salina, pero a 0,3 mg, la mediana de supervivencia aumentó a 63 días, proporcionando una mejora significativa en comparación con los animales tratados con solución salina ( $P = 0,006$ ). El segundo estudio, utilizando 0,3 mg de Emab-CL2A-SN-38, confirmó una mayor supervivencia en comparación con el grupo tratado con solución salina (75 frente a 40 días;  $P < 0,0001$ ). La especificidad de esta respuesta no fue evidente en el primer estudio, en donde la mediana de supervivencia del conjugado irrelevante Lmab-CL2A-SN-38 y Emab-CL2A-SN-38 no fue diferente a los niveles de dosis de 0,15 o 0,3 mg (42 frente a 49 días y 63 frente a 63 días para el Emab-CL2A-SN-38 frente a los conjugados anti-CEACAM5-CL2A-SN-38 a los 2 niveles de dosis, respectivamente). Sin embargo, en el segundo estudio, la dosis de 0,3 mg de Emab-CL2A-SN-38 proporcionó una supervivencia significativamente mejorada con respecto al conjugado irrelevante (75 días frente a 49;  $P < 0,0001$ ). Nuevamente, lo más probable es que la dificultad para mostrar especificidad en este modelo esté relacionada con una baja expresión de CD22.

La combinación del Emab-CL2A-SN-38 específico con veltuzumab aumenta sustancialmente la supervivencia, con indicios de respuestas más intensas que las del Lmab-CL2A-SN-38 de control. Por ejemplo, en el primer estudio, los animales tratados con veltuzumab y con 0,15 o 0,3 mg del conjugado de control tuvieron una mediana de supervivencia de 98 y 91 días, respectivamente, que fue similar a la de veltuzumab solo (91 días; no se muestra). Sin embargo, veltuzumab y 0,15 mg del conjugado específico Emab-CL2A-SN-38 aumentó la mediana de supervivencia a 140 días. Aunque esta mejora no fue significativamente mayor que la de veltuzumab solo ( $P = 0,257$ ), cuando la dosis de Emab-CL2A-SN-38 se aumentó a 0,3 mg con veltuzumab, 6 animales de 10 seguían vivos al final del estudio, proporcionando una ventaja de supervivencia significativa sobre el conjugado de control y veltuzumab ( $P = 0,0002$ ). En un segundo estudio, la mediana de supervivencia de veltuzumab solo fue más corta que en el primero (77 frente a 91 días), sin embargo, la mediana de supervivencia para el conjugado de control con veltuzumab fue nuevamente de 91 días, que ahora proporcionó una ventaja de supervivencia significativa sobre veltuzumab solo ( $P < 0,0001$ ). La combinación del conjugado específico Emab-CL2A-SN-38 con veltuzumab amplió la mediana de supervivencia a 126 días, que fue significativamente más larga que la mediana de supervivencia de 75 y 77 días para Emab-CL2A-SN-38 y veltuzumab solo, respectivamente ( $P < 0,0001$  para cada uno). Sin embargo, en este estudio, no se cumplió de todo con los requisitos para una mejora estadística sobre la combinación con el conjugado de control anti-CEACAM5-CL2A-SN-38 ( $P = 0,078$ ).

## Análisis

En los últimos 10 años, los ADC han logrado avances sustanciales en la terapia del cáncer, aunque también ha habido algunos contratiempos. Los avances se produjeron en gran medida cuando los investigadores optaron por examinar agentes que eran demasiado tóxicos para utilizarse en solitario, pero cuando se acoplaban a un anticuerpo, estos agentes denominados ultratóxicos produjeron respuestas sustancialmente mejoradas en las pruebas preclínicas. La reciente aprobación de brentuximab vedotin, un conjugado de auristatina, en el linfoma de Hodgkin y el éxito clínico con el conjugado trastuzumab-DMI anti-HER2-maitansina como agente único en el cáncer de mama refractivo a trastuzumab no conjugado sugiere que estos ADC portadores de agentes ultratóxicos se están convirtiendo en modalidades de tratamiento aceptadas. Sin embargo, los conjugados preparados con agentes que de por sí son fuertes en el intervalo picomolar, pueden tener un mayor riesgo de toxicidad, como sugiere la reciente decisión de retirar del mercado gemtuzumab ozogamicina, el conjugado anti-CD33-caliqueamicina (Ravandi, 2011, J Clin Oncol 29:349-51). Por tanto, el éxito de un ADC (conjugado de anticuerpo y fármaco) puede depender de la identificación de las características químicas adecuadas para unir entre sí el fármaco y el anticuerpo, así como de definir una diana adecuada que esté suficientemente expresada para permitir un suministro adecuada y selectivo del agente citotóxico.

Desarrollamos un enlazador CL2A para acoplar SN-38 con la IgG, lo que permite que SN-38 se libere lentamente del conjugado en suero (aproximadamente un 50 % al día). Con este enlazador, un anticuerpo que se internaliza lentamente podría ser una terapia eficaz, tal vez porque el conjugado localizado en un tumor libera una cantidad suficiente de fármaco localmente, incluso sin estar internalizado. El enlazador CL2A también se utilizó recientemente con un anticuerpo contra TROP-2 que se informó que se internalizaba rápidamente (Cardillo *et al.*, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69.). Por tanto, parece que el mecanismo de liberación lenta es beneficioso para los anticuerpos internalizantes y los no internalizantes.

En este informe, ampliamos nuestra evaluación del enlazador CL2A comparando conjugados de SN-38 preparados con epratuzumab, una IgG anti-CD22 de rápida internalización y veltuzumab, una IgG anti-CD20 de internalización lenta, para el tratamiento de neoplasias malignas de células B. Estudios anteriores con el precursor murino de epratuzumab habían indicado que la mayor parte del anticuerpo se internaliza en 1 hora y el 50 % de CD22 se reexpresa en la superficie celular en 5 horas (Shih *et al.*, 1994, Int J Cancer 56:538-45). Este proceso de internalización y reexpresión permitiría el suministro intracelular que podría compensar una menor expresión en la superficie de CD22. Dado que muchas de las neoplasias malignas de células B expresan mucho más CD20 que CD22, un conjugado dirigido a CD20 podría suministrar más moles de fármaco al liberar su carga útil tóxica después de localizarse en el tumor.

Estudios de citotoxicidad *in vitro* no pudieron discriminar la fuerza de los conjugados específicos ni siquiera la de un conjugado irrelevante debido a la liberación de SN-38 del conjugado en el medio. De hecho, SN-38 solo fue algo más fuerte que los conjugados, lo que puede reflejar su capacidad acelerada para entrar a la célula y activar la topoisomerasa I. Debido a que otros estudios revelaron que los conjugados requerían una exposición de 48 horas antes de que pudieran verse los primeros signos de apoptosis, llegamos a la conclusión de que en ensayos *in vitro* la prueba no podría discriminar la fuerza de estos 2 conjugados y, por lo tanto, se recurrió a estudios *in vivo*.

En modelos de xenoinjerto, ambos conjugados tenían una actividad antitumoral similar contra tumores Ramos, cuya citometría de flujo había indicado que expresaban casi 15 veces más CD20 que CD22. Esto confirmó la selección del conjugado Emab anti-CD22-CL2A-SN-38, especialmente porque podría combinarse con la terapia de Vmab anti-CD20 no conjugado sin preocuparse de que cualquiera de los agentes interfiera con la unión del otro agente. De hecho, si se utilizaba un conjugado anti-CD20-CL2A-SN-38, la dosis total de proteína IgG suministrada probablemente estaría por debajo de un nivel normalmente necesario para tratamientos eficaces con anticuerpos anti-CD20 no conjugados, ya que la toxicidad limitante de la dosis dependería del contenido de SN-38. La adición de más anti-CD20 sin marcar a un conjugado anti-CD20-CL2A-SN-38 correría el riesgo de reducir la captación del conjugado y posiblemente de disminuir su eficacia. Sin embargo, como mostramos anteriormente en estudios de combinación utilizando epratuzumab radiomarcado con veltuzumab no conjugado, puede obtenerse beneficio de ambos agentes suministrados a sus dosis máximas eficaces y seguras. Los estudios *in vitro* mostraron que veltuzumab, incluso sin entrecruzamiento que se utiliza para potenciar la señalización, aceleraba los acontecimientos apoptóticos iniciados con Emab-CL2A-SN-38. Por tanto, siempre que el conjugado Emab-CL2A-SN-38 sea tan eficaz como el conjugado anti-CD20, la selección del conjugado Emab-CL2A-SN-38 es una elección lógica porque permite una terapia combinada más eficaz, incluso en tumores en los que uno o ambos antígenos tienen una expresión baja.

Dado que la mayoría de los ADC que utilizan fármacos ultratóxicos están unidos de forma estable, también se sometió a ensayo un conjugado anti-CD22-CL2E-SN-38, estable en suero, aunque intracelularmente escindible, pero que se determinó que era de 40 a 55 veces menos fuerte que con el enlazador CL2A. Otros han examinado una variedad de fármacos ultratóxicos conjugados con anticuerpos anti-CD20 o anti-CD22, descubriendo que los conjugados internalizantes son generalmente más activos, pero también observando que incluso los anticuerpos de internalización lenta podrían ser eficaces si el fármaco liberado se introdujera en la membrana celular. Aunque el enlazador de tipo CL2A puede ser apropiado para SN-38, puede que no sea óptimo para un agente más tóxico, donde incluso una pequeña liberación sostenida en el suero aumentaría la toxicidad y comprometería la ventana terapéutica.

Emab-CL2A-SN-38 fue activo a una dosis acumulada de 0,6 mg en ratones portadores de Ramos (75  $\mu$ g dos veces

por semana durante 4 semanas), que se extrapola a una dosis humana de solo 2,5 mg/kg. Por tanto, Emab-CL2A-SN-38 debe tener una enorme ventana terapéutica en los pacientes. Además, se combinó una dosis eficaz y segura del conjugado anti-TROP-2-CL2A-SN-38 con una dosis máxima tolerada de un anticuerpo marcado con <sup>90</sup>Y sin aumento apreciable de toxicidad pero con eficacia mejorada (Sharkey *et al.*, 2011, *Mol Cancer Ther* 10:1072-81). Por tanto, el perfil de seguridad y eficacia de estos conjugados de anticuerpo SN-38 es muy favorable para otras terapias de combinación.

Aunque el irinotecán no se utiliza habitualmente para el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, SN-38 era tan fuerte en las líneas celulares de linfoma y leucemia como en los tumores sólidos (Cardillo *et al.*, 2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69.). En la línea celular WSU-FSCCL, los conjugados de IgG específicos e irrelevantes fueron significativamente mejores que el irinotecán, mientras que en Ramos, la mediana del TTP con el conjugado irrelevante fue más larga pero no significativamente mejor que con el irinotecán. Estos resultados están en consonancia con los de otros estudios que han demostrado que una IgG inespecífica es un excelente transportador de fármacos y más fuerte *in vivo* que el fármaco libre o los conjugados preparados con albúmina o polietilenglicol (PEG)-Fc. Aunque el conjugado de PEG-SN-38 tuvo efectos antitumorales significativos, este se administró en las cantidades máximas toleradas, que varían de 10 a 30 mg/kg de equivalentes de SN-38 (Sapra *et al.*, 2009, *Haematologica* 94:1456-9). Por el contrario, la dosis máxima acumulada de SN-38 suministrada durante 4 semanas a animales portadores de Ramos fue de sólo 1,6 mg/kg (es decir, se suministra una dosificación de 0,25 mg de Emab-SN-38 dos veces a la semana durante 4 semanas) y no fue tóxica.

La actividad terapéutica específica de Emab-CL2A-SN-38 pareció mejorar en líneas celulares con mayor expresión de CD22. Por ejemplo, en la línea celular Ramos, los efectos terapéuticos específicos de Emab-CL2A-SN-38 solo, se registraron en 2 de los 3 niveles de dosis diferentes examinados, y un número considerable de tumores fue completamente extirpado. Por el contrario, en la línea celular WSU-FSCCL, que tenía una expresión de CD22 aproximadamente 2,5 veces más baja, Emab-CL2A-SN-38 mejoró la supervivencia significativamente en comparación con el conjugado anti-CEACAM5-CL2A-SN-38 irrelevante en 1 de 2 estudios. Sin embargo, es importante enfatizar que cuando se utiliza en combinación con la terapia de anti-CD20 no conjugado, Emab-CL2A-SN-38 amplifica la respuesta terapéutica. Por tanto, la combinación de estos dos tratamientos podría aumentar la respuesta incluso en situaciones en las que CD22 no está muy expresado.

En conclusión, utilizando el enlazador CL2A-SN-28 menos estable, el conjugado Emab anti-CD22-CL2A-SN-38 fue igualmente activo en dosis no tóxicas *in vivo* como un conjugado anti-CD20-CL2A-SN-38 similar, a pesar de que la expresión de CD20 era más de un logaritmo superior a la de CD22. Las respuestas terapéuticas beneficiadas por la combinación de Emab-CL2A-SN-38 con la terapia anti-CD20 de Vmab no conjugado, incluso cuando la expresión de CD22 era baja, sugieren que la terapia combinada podría mejorar las respuestas en diversas neoplasias malignas de células B cuando ambos antígenos están presentes. Los estudios actuales sugieren que esta combinación es muy fuerte en diversos modelos preclínicos de linfoma y leucemia, sin embargo, parece tener menos toxicidad para el hospedador.

#### **Ejemplo 6. Conjugados anti-CD74-CL2A-SN-38 para el tratamiento de cánceres humanos CD74+**

CD74 es una diana atractiva para los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), porque se internaliza y se recicla después de la unión del anticuerpo. CD74 se asocia principalmente con cánceres hematológicos, pero también se expresa en cánceres sólidos. Por lo tanto, se examinó la utilidad de los ADC preparados con el anticuerpo anti-CD74 humanizado, milatuzumab, para la terapia de tumores sólidos que expresan CD74. Se prepararon milatuzumab-doxorrubicina y dos conjugados de milatuzumab-SN-38 con enlazadores escindibles (CL2A y CL2E), que difieren en cuanto a su estabilidad en suero y en cómo liberan SN-38 en el lisosoma. La expresión de CD74 se determinó mediante citometría de flujo e inmunohistología. Se realizaron estudios *in vivo* de citotoxicidad y terapéuticos en las líneas celulares de cáncer humano A-375 (melanoma), HuH-7 y Hep-G2 (hepatoma), Capan-1 (pancreático) y NCI-N87 (gástrico) y linfoma de Burkitt de la línea celular Raji. El ADC de milatuzumab-SN-38 se comparó con los ADC de SN-38 preparados con anticuerpos anti-TROP-2 y anti-CEACAM6 en xenoinjertos que expresaban sus antígenos diana.

Milatuzumab-doxorrubicina fue más eficaz en el modelo de linfoma, mientras que en A-375 y Capan-1, solo el milatuzumab-CL2A-SN-38 mostró un beneficio terapéutico. A pesar de que la expresión de CD74 en la superficie era mucho más baja que la de TROP-2 o CEACAM6, milatuzumab-CL2A-SN-38 tuvo una eficacia similar en Capan-1 que el anti-TROP-2-CL2A-SN-38, pero en NCI-N87, los conjugados anti-CEACAM6 y anti-TROP-2 fueron superiores. Los estudios en 2 líneas celulares de hepatoma a un nivel de dosis sencilla mostraron un beneficio significativo sobre los animales tratados con solución salina, pero no contra un conjugado de IgG irrelevante. CD74 es una diana adecuado para los ADC en algunos xenoinjertos de tumores sólidos, con eficacia influenciada en gran medida por la uniformidad de la expresión de CD74, y con conjugados de SN-38 ligados a CL2A que proporcionan las mejores respuestas terapéuticas.

#### *Introducción*

CD74, citado como cadena invariante o Ii, es una glucoproteína transmembrana de tipo II que se asocia con HLA-DR e inhibe la unión de péptidos antigénicos con la estructura de presentación del antígeno de clase II. Actúa como una molécula acompañante, dirigiendo los complejos de cadena invariante a endosomas y lisosomas, como una molécula

acesoria en la maduración de células B, utilizando una ruta mediada por NF- $\kappa$ B, y en respuestas de células T a través de interacciones con CD44 (Naujokas *et al.*, 1993, Cell 74:257-68), y es un receptor de la citocina proinflamatoria, factor inhibidor de la migración de macrófagos (Leng *et al.*, 2003, J Exp Med 197: 1467-76), que participa en la activación de las rutas de supervivencia y proliferación celular.

5 En tejidos humanos normales, CD74 se expresa principalmente en células B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, subconjuntos de células T activadas y epitelio tímico (no se muestra), y se expresa en más del 90 % de los tumores de células B (Burton *et al.*, 2004, Clin Cancer Res 10:6606-11; Stein *et al.*, 2004, Blood 104: 3705-11). Los primeros estudios tenían datos contradictorios sobre si CD74 está presente en la membrana, en parte porque los anticuerpos contra la cadena invariante eran específicos para la parte citoplásmica de la molécula, pero también porque hay relativamente pocas copias en la superficie y su semivida en la superficie celular es muy corta. Aproximadamente el 80 % del CD74 en la superficie celular está asociado con el antígeno HLA-DR del MHC II (Roche *et al.*, 1993, PNAS USA 90:8581-85). Utilizando el anticuerpo anti-CD74 murino, LL1, se estimó que la línea celular Raji de linfoma de Burkitt tenía  $4,8 \times 10^4$  copias/célula, pero debido al rápido tránsito intracelular,  $\sim 8 \times 10^6$  moléculas de anticuerpo se internalizaron y catabolizaron por día (Hansen *et al.*, 1996, Biochem J 320:293-300). Por tanto, la internalización de CD74 es muy dinámica, desplazándose el anticuerpo rápidamente desde la superficie y descargándose en la célula, seguido de la reexpresión de CD74 en la superficie. La internalización de Fab' se produce tan rápidamente como la unión de IgG, lo que indica que no se requiere unión bivalente. Estudios posteriores realizados con una versión injertada con CDR de LL1 murino, milatuzumab (hLL1), descubrieron que el anticuerpo podría alterar la proliferación y la migración de células B y la expresión de moléculas de adhesión (Stein *et al.*, 2004, Blood 104: 3705-11; Qu *et al.*, 2002, Proc Am Assoc Cancer Res 43:255; Frolich *et al.*, 2012, Arthritis Res Ther 14:R54), pero las excepcionales propiedades de internalización del anticuerpo anti-CD74 lo convirtieron en un transportador eficaz para el suministro intracelular de compuestos terapéuticos contra el cáncer (p. ej., Griffiths *et al.*, 2003, Clin Cancer Res 9:6567-71). Basándose en resultados de toxicología y eficacia preclínica, se han iniciado ensayos clínicos en Fase I con milatuzumab-doxorrubicina en mieloma múltiple (Kaufman *et al.*, 2008, ASH Annual Meeting Abstracts, 112:3697), así como en linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica.

De manera interesante, CD74 también se expresa en cánceres no hematopoyéticos, como el gástrico, renal, de vejiga urinaria, de pulmón no microcítico, algunos sarcomas y glioblastoma (p. ej., Gold *et al.*, 2010, Int J Clin Exp Pathol 4:1-12) y, por lo tanto, puede ser una diana terapéutica para los tumores sólidos que expresan este antígeno. Dado que un conjugado de milatuzumab-doxorrubicina fue muy activo en modelos de cánceres hematológicos, fue una elección lógica para esta evaluación. Sin embargo, recientemente se desarrollaron procedimientos para acoplar el inhibidor de topoisomerasa I sumamente fuerte, SN-38, con anticuerpos. SN-38 es la forma activa de irinotecán, cuya farmacología y metabolismo son muy conocidos. Estos conjugados tienen fuerza nanomolar en líneas celulares de tumores sólidos y se descubrió que eran activos con anticuerpos que no se internalizaban activamente. Estudios anteriores indicaron una preferencia por un enlazador (CL2A) que permitía que SN-38 se disociara del conjugado en suero con una semivida de  $\sim 1$  día, en lugar de otros enlazadores que eran más o menos estables en suero. Sin embargo, dada la excepcional capacidad de internalización de milatuzumab, se desarrolló un nuevo enlazador (CL2E) que es sumamente estable en suero, pero que puede liberar SN-38 cuando se capta en el lisosoma.

La investigación actual examina las posibilidades de utilizar estos tres conjugados de milatuzumab anti-CD74, uno con doxorrubicina y dos conjugados con SN-38, para una terapia eficaz principalmente contra tumores sólidos.

#### 40 *Materiales y Métodos*

Líneas de células tumorales humanas. Las líneas celulares Raji de linfoma de Burkitt, A-375 (melanoma), Capan-1 (adenocarcinoma pancreático), NCI-N87 (carcinoma gástrico), Hep-G2 de hepatoma y MC/CAR de mieloma se adquirieron en la American Tissue Culture Collection (Manassas, VA). La línea celular HuH-7 de hepatoma se adquirió en el Japan Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japón). Todas las líneas celulares se cultivaron en una incubadora humificada con CO<sub>2</sub> (5 %) a 37° C en un medio recomendado que contenían entre un 10 % y un 20 % de suero bovino fetal y medios complementados. Las células se sometieron a pases <50 veces y se comprobaron regularmente para detectar micoplasmas.

Anticuerpos y métodos de conjugación. Milatuzumab (MAb anti-CD74), epratuzumab (anti-CD22), veltuzumab (anti-CD20), labetuzumab (anti-CEACAM5), hMN15 (anti-CEACAM6) y hRS7 (anti-TROP-2) son anticuerpos monoclonales de IgG1 humanizados. Se prepararon los enlazadores CL2A y CL2E y sus derivados SN-38 y se conjugaron con anticuerpos como se describe en los Ejemplos anteriores. Los conjugados de milatuzumab-doxorrubicina se prepararon como se describió anteriormente (Griffiths *et al.*, 2003, Clin Cancer Res 9:6567-71). Todos los conjugados se prepararon mediante reducción con disulfuro de la IgG, seguido de reacción con los correspondientes derivados de maleimida de estos enlazadores. Los análisis espectrofotométricos estimaron que la proporción de sustitución molar de fármaco:IgG era de 5-7 (1,0 mg de la proteína contiene  $\sim 16$   $\mu$ g de SN-38 o 25  $\mu$ g de equivalente de doxorrubicina).

Unión celular y citotoxicidad *in vitro*. Los ensayos para comparar la unión celular del milatuzumab conjugado y no conjugado con células positivas a antígeno y los ensayos de citotoxicidad utilizaron el método de reducción de colorante MTS (Promega, Madison, WI).

Citometría de flujo e inmunohistología. La citometría de flujo se realizó de manera que proporcionó una evaluación

solo de la membrana o la membrana unida y del antígeno citoplasmático. La inmunohistología se realizó en secciones incluidas en parafina fijadas con formalina de xenoinjertos de tumores subcutáneos, con tinción sin métodos de recuperación de antígeno, utilizando anticuerpos a 10 µg/ml que se revelaron con un conjugado anti-IgG humana.

5 Estudios *in vivo*. Se adquirieron ratonas lampiñas (de 4 a 8 semanas de vida) o ratonas SCID (de 7 semanas de vida) en Taconic (Germantown, NY) y se utilizaron después de una cuarentena de 1 semana. Todos los agentes, incluidos los controles de solución salina, se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 4 semanas. En el apartado de Resultados se proporcionan las dosis específicas. La toxicidad se evaluó mediante mediciones de peso semanales. Para el modelo de linfoma de Burkitt de la línea celular Raji, las ratonas SCID recibieron una inyección intravenosa de  $2,5 \times 10^6$  células Raji en 0,1 ml de medio. Cinco días después, los animales recibieron una sola inyección intravenosa (0,1 ml) del conjugado o de solución salina (N = 10/grupo). Las ratonas se examinaron diariamente para detectar signos de sufrimiento y parálisis, y se sacrificaron cuando desarrollaron parálisis en las extremidades traseras, una pérdida de peso inicial >15 % o si estaban moribundas (criterios indirectos de valoración de supervivencia).

15 Los tumores subcutáneos se midieron con un calibrador en dos dimensiones y el volumen tumoral (VT) se calculó como  $L \times w^2/2$ , donde L es el diámetro más largo y w es el más corto. Las mediciones se realizaron al menos una vez a la semana, sacrificando a los animales cuando los tumores crecieron hasta alcanzar 1,0 cm<sup>3</sup> (es decir, criterio indirecto de valoración de supervivencia). La línea celular de melanoma A-375 ( $6 \times 10^6$  células en 0,2 ml) se implantó en las ratonas lampiñas y la terapia comenzó cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de  $0,23 \pm 0,06$  cm<sup>3</sup> (N = 8/grupo). La línea celular Capan-1 se implantó por vía subcutánea en las ratonas lampiñas utilizando una combinación de suspensión tumoral de tumores sometidos a pases en serie (0,3 ml de una suspensión tumoral al 15 % p/v) combinada con  $8 \times 10^6$  células de cultivo tisular. Los tratamientos comenzaron cuando el VT alcanzó un tamaño promedio de  $0,27 \pm 0,05$  cm<sup>3</sup> (N = 10/grupo). Los xenoinjertos de tumor gástrico NCI-N87 comenzaron inyectando por vía subcutánea 0,2 ml de una mezcla 1:1 (v/v) de matrigel y  $1 \times 10^7$  células de cultivo terminal. La terapia comenzó cuando el VT alcanzó un tamaño promedio de  $0,249 \pm 0,045$  cm<sup>3</sup> (N = 7/grupo). Para desarrollar los xenoinjertos de hepatoma Hep-G2 y HuH-7 en ratonas lampiñas, se siguió el mismo procedimiento. La terapia comenzó cuando Hep-G2 alcanzó un tamaño promedio de  $0,364 \pm 0,062$  cm<sup>3</sup> (N = 5/grupo) y HuH-7 alcanzó un tamaño promedio de  $0,298 \pm 0,055$  cm<sup>3</sup> (N = 5/grupo).

25 La eficacia se expresó en curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, utilizando los criterios indirectos de valoración mencionados anteriormente para determinar los tiempos de la mediana de supervivencia. El análisis se realizó mediante una prueba de orden logarítmico (Mantel-Cox) utilizando el programa informático GraphPad Prism (LaJolla, CA), con significado a una  $P < 0,05$ .

### Resultados

35 Expresión de CD74 en líneas de células tumorales humanas y xenoinjertos. Se identificaron seis líneas celulares procedentes de 4 tipos diferentes de tumores sólidos como CD74 positivas basándose principalmente en el análisis de células permeabilizadas (Tabla 10), ya que la IFM de CD74 solo en la membrana en las líneas de células de tumores sólidos era muy a menudo <2 veces más alta que la IFM de fondo (excepto la línea celular de melanoma A-375). La expresión de CD74 en la superficie en Raji fue > 5 veces más alta que en las líneas celulares de tumores sólidos, pero el CD74 total en las células Raji permeabilizadas fue similar en la mayoría de las líneas celulares de tumores sólidos.

40 **Tabla 10.** Expresión de CD74 mediante citometría de flujo expresada como intensidad de fluorescencia media (IFM) de células seleccionadas positivas a milatuzumab.

Línea celular	Superficie		Superficie y citoplasma		
	hLL1 (fondo) <sup>a</sup>	Proporción de IFM de hLL1: fondo	hLL1 (fondo) <sup>b</sup>	Proporción de IFM de hLL1: fondo	
°Panc CA	Capan-1	22 (12)	1,8	248 (5)	49,6
Gástrico	Hs746T	17 (8)	2,1	144 (5)	28,8
	NCI-N87	5 (4)	1,3	220 (6)	36,7
Melanoma	A-375	16 (3)	5,3	185 (6)	30,8
Hepatoma	Hep-G2	9 (6)	1,5	156 (5)	31,2
	HuH-7	8 (5)	1,6	114 (4)	28,5
Linfoma	Raji	59 (3)	19,6	143 (5)	28,6

NR, no realizado

<sup>a</sup>IFM de fondo de células incubadas solo con GAH-FITC.

La inmunohistología mostró que los xenoinjertos subcutáneos de Raji tenían una tinción en gran parte uniforme e intensa, con marcaje destacable en la superficie celular (no se muestra). La línea celular de hepatoma Hep-G2 tuvo la

captación más uniforme de los tumores sólidos, con tinción moderadamente fuerte, pero predominantemente citoplasmática (no se muestra), seguido de la línea celular de melanoma A-375 que tenía una tinción algo menos uniforme con una expresión más intensa, aunque sobre todo citoplasmática (no se muestra). Las líneas celulares de carcinoma pancreático Capan-1 (no se muestra) y gástrico NCI-N87 (no se muestra) tenían tinción de CD74 de moderada (Capan-1) a intensa (NCI-N87), aunque no se distribuía de manera uniforme. La línea celular de hepatoma HuH-7 (no se muestra) tenía la tinción menos uniforme y más débil.

Inmunorreactividad de los conjugados. Los valores de  $K_d$  de milatuzumab no conjugado y de los conjugados milatuzumab-CL2A-SN-38 y milatuzumab-CL2E-SN-38 no fueron significativamente diferentes, con un promedio de 0,77 nM, 0,59 nM y 0,80 nM, respectivamente. Los valores de  $K_d$  para el milatuzumab no conjugado y conjugado con doxorubicina medidos en la línea celular de mieloma múltiple MC/CAR fueron  $0,5 \pm 0,02$  nM y  $0,8 \pm 0,2$  nM, respectivamente (Sapra *et al.*, 2008, Clin Cancer Res 14:1888-96).

Liberación de fármacos *in vitro* y estabilidad en suero de los conjugados. Los mecanismos de liberación de SN-38 de los enlazadores CL2A y CL2E protegidos con mercaptoetanol, se determinaron en un entorno que simulaba parcialmente las condiciones lisosomales, concretamente, pH bajo (pH 5,0) y con o sin catepsina B. El sustrato CL2E-SN-38 era inerte a pH 5 sin la enzima (no se muestra), pero con catepsina B, la escisión en el sitio de Phe-Lys procedió rápidamente, con una semivida de 34 min (no se muestra). La formación de SN-38 activo requiere la ciclación intramolecular del enlace de carbamato en la 10<sup>a</sup> posición de SN-38, que se produce más lentamente, con una semivida de 10,7 h (no se muestra).

Como cabía esperar, la catepsina B no tuvo ningún efecto sobre la liberación de SN-38 activo en el enlazador CL2A. Sin embargo, CL2A tiene un enlace de carbonato de bencilo escindible, que libera el SN-38 activo a una tasa similar a la del enlazador CL2E a un pH de 5,0, con una semivida de ~ 10,2 h (no se muestra). El conjugado de milatuzumab-doxorrubicina, que tiene un enlace acilhidrazona sensible al pH, tuvo una semivida de 7 a 8 h a un pH de 5,0 (no se muestra).

Aunque todos estos enlazadores liberan el fármaco a tasas relativamente similares en condiciones de relevancia para los lisosomas, tienen estabilidades muy diferentes en suero. Milatuzumab-CL2A-SN-38 liberó el 50 % de SN-38 libre en  $21,55 \pm 0,17$  h (no se muestra), consecuente con otros conjugados CL2A-SN-38. Sin embargo, el conjugado CL2E-SN-38, era muy inerte, con una semivida extrapolada a -2 100 h. El conjugado de milatuzumab-doxorrubicina liberó el 50 % de la doxorubicina en 98 h, que era similar a otros 2 conjugados de anticuerpo-doxorrubicina (no se muestra).

Citotoxicidad. Un problema importante relacionado con la evaluación de estos conjugados fue la fuerza relativa de la doxorubicina libre y SN-38 en líneas celulares hematopoyéticas y de tumores sólidos. Nuestro grupo informó anteriormente que SN-38 era activo en varias líneas celulares de linfoma de células B y leucemia aguda, con fuerzas que variaban de 0,13 a 2,28 nM (Sharkey *et al.*, 2011, Mol Cancer Ther 11:224-34). La fuerza de SN-38 en 4 de las líneas celulares de tumores sólidos, que después se utilizaron en estudios de terapia *in vivo*, variaba de 2,0 a 6 nM (no se muestra). La doxorubicina tuvo una respuesta mixta, con una fuerza de 3-4 nM en las líneas celulares de linfoma Raji y de melanoma A-375, pero fue casi 10 veces menos fuerte contra las líneas celulares Capan-1, NCI-N87 y Hep G2. En otros estudios en los que se comparó la fuerza de SN-38 con la de la doxorubicina se descubrió: cáncer de colon LS174T, 18 frente a 18 (fuerza nM de SN-38 frente a doxorubicina, respectivamente); cáncer de mama MDA-MB-231, 2 frente a 2 nM; cáncer de ovario SK-OV-4, 18 frente a 90 nM; adenocarcinoma de pulmón Calu-3, 32 frente a 582 nM; Cáncer pancreático Capan-2, 37 frente a 221 nM; y cáncer de pulmón microcítico NCI-H466, 0,1 frente a 2 nM. Por tanto, SN-38 fue de 5 a 20 veces más fuerte que la doxorubicina en 4 de estas 6 líneas celulares, con fuerza similar en LS174T y MDA-MB-231. En conjunto, estos datos indican que la doxorubicina es menos eficaz contra los tumores sólidos que SN-38, mientras que SN-38 parece ser igualmente eficaz en tumores sólidos y hematopoyéticos.

Como cabía esperar, las 3 formas conjugadas eran a menudo un orden de magnitud menos fuerte que el fármaco libre *in vitro*, dado que se espera que ambos fármacos se transporten fácilmente a las células, mientras que los conjugados farmacológicos requieren la unión del anticuerpo para transportar el fármaco al interior de la célula (no se muestra). El conjugado SN-38 ligado a CL2A es una excepción, dado que durante el período de ensayo de 4 días más del 90 % del SN-38 se libera desde el conjugado al medio (Cardillo *et al.*, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69; Sharkey *et al.*, 2011, Mol Cancer Ther 11:224-34). Por tanto, incluso si el conjugado se internalizó rápidamente, sería difícil percibir diferencias entre el fármaco libre y el fármaco ligado a CL2A.

El SN-38 ligado a CL2E estable actuó comparativamente bien en la línea celular Raji, en comparación con el SN-38 libre, pero tenía una fuerza sustancialmente menor (de 7 a 16 veces) en las 4 líneas celulares de tumores sólidos, lo que sugiere que la expresión relativamente baja de CD74 en la superficie puede estar jugando un papel en la minimización del transporte de fármacos en estos tumores sólidos. El conjugado de milatuzumab-doxorrubicina tenía diferencias sustanciales en cuanto a su fuerza en comparación con la doxorubicina libre en todas las líneas celulares, que era de magnitud similar a la de los conjugados CL2E-SN-38 con SN-38 libre en las líneas celulares de tumores sólidos.

En las 6 líneas celulares adicionales mencionadas anteriormente, el conjugado de milatuzumab-CL2A-SN-38 fue de 9 a 60 veces más fuerte que el conjugado de milatuzumab-doxorrubicina (no se muestra), pero de nuevo, este resultado

estaba influenciado en gran medida por el hecho de que el conjugado ligado a CL2A libera la mayor parte de su SN-38 en los medios durante el período de incubación de 4 días, mientras que el conjugado de doxorubicina liberaría como máximo el 50 % de su fármaco durante este mismo tiempo. El milatuzumab ligado a CL2E no se examinó en estas otras líneas celulares.

5 Terapia *in vivo* de xenoinjertos de tumores humanos. Estudios anteriores *in vivo* con los conjugados de milatuzumab-doxorrubicina o SN-38 preparados con varios anticuerpos habían indicado que eran eficaces a dosis mucho más bajas que su dosis máxima tolerada (Griffiths *et al.*, 2003, Clin Cancer Res 9:6567-71; Sapra *et al.*, 2005, Clin Cancer Res 11:5257-64; Govindan *et al.*, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61; Cardillo *et al.*, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69; Sharkey *et al.*, 2011, Mol Cancer Ther 11: 224-34), y por tanto los ensayos *in vivo* se centraron en la comparación de  
10 cantidades similares, pero fijas, de cada conjugado a niveles que fueron bien tolerados.

Los estudios iniciales examinaron primero los conjugados de doxorubicina y SN-38 en un modelo de linfoma Raji diseminado para estimar de qué manera comparar el conjugado de milatuzumab-doxorrubicina con los 2 conjugados de SN-38 (no se muestra). Todos los conjugados específicos fueron significativamente mejores que el conjugado de labetuzumab-SN-38 inespecífico o que los animales tratados con solución salina, que tuvieron una mediana de supervivencia de solo 20 días ( $P < 0,0001$ ). A pesar de estudios *in vitro* que indican una ventaja de hasta 8 veces para los conjugados SN-38 en Raji, la mejor supervivencia se observó con los conjugados de milatuzumab-doxorrubicina, donde todos los animales que recibieron una sola dosis de 17,5 mg/kg (350 µg) y 7/10 animales que recibieron 2,0 mg/kg (40 µg) estaban vivos al final del estudio (día 112) (p. ej., una dosis de 17,5 mg/kg de milatuzumab-doxorrubicina frente a milatuzumab-CL2A-SN-38,  $P = 0,0012$ ). La supervivencia fue significativamente menor para los  
15 conjugados CL2E-SN-38 más estables ( $P < 0,0001$  y  $P = 0,0197$ , dosis de 17,5 y 2,0 mg/kg para CL2A frente a CL2E, respectivamente), aunque estudios *in vitro* sugirieron que ambos conjugados liberarían SN-38 activo a tasas similares al internalizarse.

Se examinaron cinco líneas celulares de tumores sólidos, comenzando con la línea celular de melanoma A-375, ya que tenía la mejor respuesta *in vitro* tanto a la doxorubicina como al SN-38. Los xenoinjertos A-375 crecieron rápidamente, teniendo los animales de control tratados con solución salina una mediana de supervivencia de sólo 10,5 días (no se muestra). Una dosis de 12,5 mg/kg (0,25 mg por animal) dos veces por semana del conjugado milatuzumab-CL2A-SN-38 prolongó la supervivencia a 28 días ( $P = 0,0006$ ), que fue significativamente mejor que la del conjugado epratuzumab-CL2A-SN-38 de control que tenía una mediana de supervivencia de 17,5 días ( $P = 0,0089$ ), no siendo esta último significativamente diferente a la de los animales tratados con solución salina ( $P = 0,1967$ ). El conjugado de milatuzumab-CL2A proporcionó una supervivencia significativamente más prolongada que el conjugado de milatuzumab-CL2E-SN-38 ( $P = 0,0014$ ), que tuvo la misma mediana de supervivencia de 14 días que su conjugado de epratuzumab-CL2E-SN-38 de control. A pesar de suministrar una dosis dos veces mayor del conjugado de milatuzumab-doxorrubicina que la de los conjugados de SN-38, la mediana de supervivencia no fue mejor que la de los animales tratados con solución salina (10,5 días).

Al igual que con el modelo de melanoma A-375, en Capan-1, solo el conjugado de SN-38 ligado a CL2A fue eficaz, con una mediana de supervivencia de 35 días, significativamente diferente de la de los animales no tratados ( $P < 0,036$ ) (no se muestra), incluso a una dosis más baja (5 mg/kg; 100 µg por animal) ( $P < 0,02$ ). Ni el conjugado de milatuzumab-CL2E ni los conjugados de epratuzumab-CL2A-SN-38 inespecíficos, o una dosis 2 veces mayor del conjugado de milatuzumab-doxorrubicina, proporcionaron ninguna ventaja de supervivencia ( $P = 0,44$  frente a solución salina). Cabe destacar que en el mismo estudio con animales que recibieron la misma dosis del conjugado anti-TROP-2 CL2A-SN-38 internalizante (hRS7-SN-38; IMMU-132), la mediana de supervivencia fue igual a la de milatuzumab-CL2A-SN-38 (no se muestra). El conjugado de hRS7-CL2A-SN-38 se había identificado anteriormente como un ADC de interés para el tratamiento de una variedad de tumores sólidos (Cardillo *et al.*, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69). La IFM para hRS7 de unión en superficie en Capan-1 fue de 237 (no se muestra), en comparación con 22 para milatuzumab (véase la **Tabla 10**). Por tanto, a pesar de tener una expresión antigénica en la superficie sustancialmente menor, el conjugado de milatuzumab-CL2A-SN-38 actuó tan bien como el conjugado de hRS7-CL2A-SN-38 en este modelo.

Dado que el conjugado de milatuzumab-doxorrubicina tiene resultados terapéuticos inferiores en 2 de los xenoinjertos de tumor sólido, el enfoque cambió para comparar los conjugados de milatuzumab-SN-38 con los conjugados de SN-38 preparados con otros anticuerpos humanizados contra TROP-2 (hRS7) o CEACAM6 (hMN-15), que se expresan sumamente en la superficie de muchos tumores sólidos (Blumenthal *et al.*, 2007, BMC Cancer 7:2; Stein *et al.*, 1993, Int J Cancer 55:938-46). Se examinaron tres modelos de xenoinjerto adicionales.

En el modelo de tumor gástrico, NCI-N87, los animales recibieron una dosis de 17,5 mg/kg/dosis (350 µg) de milatuzumab-CL2A-SN-38 proporcionando cierta mejora en la supervivencia, pero no se alcanzó la significación estadística en comparación con los animales tratados con solución salina (31 frente a 14 días;  $P = 0,0760$ ) o con el conjugado de veltuzumab anti-CD20-CL2A-SN39 sin unión (21 días;  $P = 0,3128$ ) (no se muestra). Sin embargo, los conjugados de hRS7- y hMN-15-CL2A mejoraron significativamente la mediana de supervivencia a los 66 y 63 días, respectivamente ( $P = 0,0001$ ). La IFM de TROP-2 y CEACAM6, expresados en la superficie, fue de 795 y 1123, respectivamente, mucho más alta que la de CD74 que era solo de 5 (véase la **Tabla 10**). La inmunohistología mostró una expresión citoplásmica relativamente intensa de CD74 en el xenoinjerto de esta línea celular, pero lo que es más importante, estaba dispersa, apareciendo sólo en bolsas definidas dentro del tumor (no se muestra). CEACAM6 y TROP-2 se expresaron de manera más uniforme que CD74 (no se muestra), estando CEACAM6 más intensamente

presente tanto en el citoplasma como en la membrana, y encontrándose TROP-2 principalmente en la membrana. Por tanto, la supervivencia mejorada con los conjugados de anti-CEACAM6 y anti-TROP-2 refleja muy probablemente tanto una mayor densidad de antígeno como una expresión más uniforme en NCI-N87.

En la línea celular de hepatoma Hep-G2 (no se muestra), la inmunohistología mostró una expresión muy uniforme con tinción citoplasmática moderada de CD74, y la citometría de flujo indicó una expresión superficial relativamente baja (IFM = 9). La IFM de hMN-15 fue de 175 y la inmunohistología mostró una membrana bastante uniforme y expresión citoplasmática de CEACAM6, con bolsas aisladas de tinción de membrana muy intensa (no se muestra). En un estudio realizado con animales portadores de xenoinjertos Hep-G2, se descubrió que el conjugado de milatuzumab-CL2A-SN-38 prolongo la supervivencia a 45 días en comparación con 21 días en el grupo tratado con solución salina. ( $P = 0,0048$ ), mientras que el conjugado de hMN-15-CL2A-SN-38 mejoró la supervivencia a 35 días. Hubo una tendencia a favor del conjugado de milatuzumab sobre el de hMN-15-CL2A-SN-38, pero no alcanzó significación estadística (46 frente a 35 días;  $P = 0,0802$ ). Sin embargo, el conjugado de veltuzumab-CL2A-SN-38 no unido proporcionó una ventaja de supervivencia similar a la del conjugado de milatuzumab. Anteriormente observamos que los resultados terapéuticos con conjugados no unidos podrían ser similares a los del conjugado específico unido a CL2A, particularmente en dosis más altas de proteínas, pero la titulación de los conjugados específicos y de control generalmente se revela de forma selectiva. Por tanto, ninguno de los conjugados específicos proporcionó una ventaja terapéutica selectiva a estas dosis en esta línea celular.

En otro estudio realizado utilizando la línea celular de hepatoma HuH-7 (no se muestra), que tenía una expresión superficial similar, pero niveles citoplasmáticos ligeramente más bajos que los de Hep-G2 (véase la **Tabla 10**), se descubrió que el conjugado de hMN-15-SN-38 proporcionaba una ventaja de supervivencia más prolongada (35 días frente a 18) aunque no significativamente diferente en comparación con el conjugado de milatuzumab-CL2A ( $P = 0,2944$ ). Aunque los conjugados de hMN-15 y milatuzumab fueron significativamente mejores que los de los animales tratados con solución salina ( $P = 0,008$  y  $0,009$ , respectivamente), nuevamente, ninguno de los conjugados fue significativamente diferente del conjugado de veltuzumab-SN-38 inespecífico a este nivel de dosis ( $P = 0,4602$  y  $0,9033$ , respectivamente). La expresión en superficie de CEACAM6 fue relativamente baja en esta línea celular (IFM = 81), y la inmunohistología mostró que tanto CD74 (no se muestra) como CEACAM6 (no se muestra) eran muy débiles y sumamente dispersos.

#### Análisis

El enfoque de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) para la quimioterapia selectiva de tumores, es un campo de considerable interés actual (p. ej., Govindan *et al.*, 2012, *Expert Opin Biol Ther* 12:873-90; Sapra *et al.*, 2011, *Expert Opin Biol Ther* 20:1131-49. Los recientes éxitos clínicos (Pro *et al.*, 2012, *Expert Opin Biol Ther* 12:1415-21; LoRusso *et al.*, 2011, *Clin Cancer Res* 17:437-47) se han producido en gran parte gracias a la adopción de fármacos supertóxicos en lugar de los agentes quimioterapéuticos convencionales que se habían utilizado anteriormente. Sin embargo, la selección dirigida, el anticuerpo y el enlazador farmacológico, son factores que influyen en el rendimiento óptimo de un ADC. Por ejemplo, en el caso de trastuzumab-DM1, HER2 es abundante en tumores que expresan este antígeno, el anticuerpo está internalizado y el propio anticuerpo tiene actividad antitumoral, todo lo cual podría combinarse para mejorar el resultado terapéutico. En claro contraste, CD74 se expresa a un nivel mucho más bajo en la superficie de las células, pero sus propiedades exclusivas de internalización y reexpresión en la superficie han permitido que un ADC anti-CD74 milatuzumab sea eficaz en modelos de xenoinjerto de cáncer hematopoyético incluso con un fármaco moderadamente tóxico, tal como la doxorubicina (Griffiths *et al.*, 2003, *Clin Cancer Res* 9:6567-71; Sapra *et al.*, 2005, *Clin Cancer Res* 11:5257-64). Aunque la doxorubicina se utiliza con más frecuencia en cánceres hematopoyéticos, mientras que SN-38 y otras camptotecinas se administran a pacientes con tumores sólidos, decidimos evaluar la utilidad de la doxorubicina y los conjugados de SN-38 de milatuzumab en tumores sólidos. El conjugado de milatuzumab-doxorubicina fue eficaz en modelos de xenoinjerto de varios cánceres hematológicos, lo que condujo a sus ensayos clínicos (NCT01101594 y NCT01585688), mientras que varios conjugados de SN-38 fueron eficaces en modelos de tumores sólidos y hematológicos, lo que condujo a la búsqueda de 2 nuevos conjugados de SN-38 en los ensayos clínicos en Fase I de cánceres colorrectales y epiteliales diversos (NCT01270698 y NCT01631552).

*In vitro*, la doxorubicina no conjugada y el SN-38 tenían una fuerza similar a la de la doxorubicina contra la línea celular del linfoma de Raji, pero SN-38 era más fuerte en varias líneas celulares de tumores sólidos diferentes. De manera interesante, *in vivo*, el conjugado de milatuzumab-doxorubicina proporcionó la mejor respuesta en Raji en comparación con los conjugados de milatuzumab-SN-38. Sin embargo, en Capan-1 y A-375, milatuzumab-doxorubicina fue menos eficaz que el conjugado de milatuzumab SN-38 ligado a CL2A, aunque *in vitro* las pruebas habían indicado que A-375 era igualmente sensible a la doxorubicina libre que al SN-38 libre. Otras dos líneas celulares, cáncer de mama MDA-MB-231 y cáncer de colon LS174T, también tenían una fuerza similar con la doxorubicina libre que la del SN-38 *in vitro*, pero como los ensayos *in vitro* indicaban que SN-38 era igualmente eficaz en cánceres sólidos y hematológicos, y que SN-38 tenía una fuerza de 5 a 20 veces mayor que la de la doxorubicina en la mayoría de las líneas celulares de tumores sólidos evaluadas, decidimos centrarnos en los 2 conjugados de milatuzumab-SN-38 para la terapia de tumores sólidos. Sin embargo, para estimar mejor la utilidad de los conjugados de milatuzumab-SN-38, incluimos una evaluación comparativa de los ADC de SN-38 preparados con anticuerpos contra otros antígenos que están presentes en una variedad de tumores sólidos.

Anteriormente se habían investigado las respuestas terapéuticas con el conjugado de SN-38 ligado a hRS7 anti-TROP-2 CL2A internalizante en la línea celular Capan-1 (Cardillo *et al.*, 2011, Clin Cancer Res 17: 3157-69) y, por lo tanto, se comparó la eficacia de los conjugados de milatuzumab y hRS7 SN-38. En este estudio, ambos conjugados mejoraron significativamente la supervivencia en comparación con los anticuerpos de control, siendo cada uno de los conjugados de SN-38 ligados a CL2A superior a los conjugados de ligados a CL2E. Dado que la citometría de flujo había indicado que la expresión de TROP-2 era mayor que la de CD74 en Capan-1, este resultado sugirió que las capacidades de transporte de CD74, que se sabía que eran excepcionales, eran más eficaces que las de TROP-2. Sin embargo, se sabe bien que la accesibilidad a los antígenos (es decir, membrana frente a citoplasma, barreras fisiológicas y de "sitio de unión") y la distribución entre las células dentro de un tumor, son factores críticos que influyen en todas las formas de terapia dirigida, particularmente las que dependen de un suministro intracelular adecuado de un producto a las células individuales (Thurber *et al.*, 2008, Adv Drug Del Rev 60:1421-34). En situaciones en las que el antígeno no se expresa de manera uniforme en todas las células del tumor, tener un agente específico que libere lentamente su carga útil después de localizarse en el tumor, tal como los conjugados ligados a CL2A, permitiría difundir el fármaco a células vecinas inespecíficas, mejorando así su intervalo de eficacia. De hecho, la alta expresión de antígenos posiblemente podría impedir la penetración del tumor según el efecto de barrera del sitio de unión, pero el mecanismo de liberación extracelular podría proporcionar un mecanismo para que el fármaco se difunda dentro del tumor. Se cree que este mecanismo también ayuda a la eficacia de otros conjugados que hemos examinado utilizando anticuerpos poco internalizantes, tales como el anti-CEACAM5 y el anti-CEACAM6 utilizados en el presente documento. Los conjugados basados en milatuzumab dependen más de la interacción directa del anticuerpo con la célula tumoral, aprovechando la rápida internalización y reexpresión de CD74 que puede compensar su menor abundancia en la superficie de las células. Sin embargo, esta ventaja se vería mitigada cuando el CD74 está muy disperso dentro del tumor y sin un mecanismo para retener el conjugado dentro del tumor, se perdería el beneficio de la lenta liberación lenta del fármaco del conjugado. Una revisión anterior de tumores gastrointestinales humanos realizada por nuestro grupo sugiere que a menudo estos tienen un alto nivel de expresión con buena uniformidad (Gold *et al.*, 2010, Int J Clin Exp Pathol 4:1-12).

Durante nuestra evaluación inicial de enlazadores adecuados para SN-38, se examinaron diversos derivados diferentes, incluyendo un enlazador de tipo 'CL2E' que se diseñó para acoplarse en la posición 20-hidroxilo de SN-38, similar al enlazador CL2A. Sin embargo, ese conjugado de anticuerpo carecía de suficiente actividad antitumoral y no se prosiguió. Dadas las excepcionales propiedades de internalización de milatuzumab, decidimos revisar las propiedades químicas del enlazador SN-38, con la hipótesis de que la internalización rápida de un conjugado de CD74 mejoraría la carga de fármaco de un conjugado más estable. Supusimos que si el grupo saliente era fenólico, esto podría promover la ciclación y, por lo tanto, el enlazador CL2E se diseñó para unirse en la posición fenólica 10 de SN-38.

Al inicio, el conjugado de SN-38 ligado a CL2E tenía una IC<sub>50</sub> prometedora similar a la del conjugado de CL2A en la línea celular Raji, lo que era consecuente con la opinión de que si se internalizaba rápidamente, ambos conjugados liberarían la forma activa de SN-38 aproximadamente a la misma velocidad. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la actividad *in vitro* del conjugado CL2A está influenciada en gran medida por la liberación de SN-38 en el medio y no refleja necesariamente la captación por el conjugado intacto. Cuando se descubrió que el conjugado ligado a CL2E era mucho menos fuerte en las líneas celulares de tumores sólidos que el conjugado de CL2A, esto sugirió que la expresión de la superficie inferior de CD74 afectaba a la internalización de SN-38 a través de la unión de milatuzumab. Sin embargo, cuando los estudios *in vivo* en Raji mostraron que el milatuzumab-CL2A-SN-38 era superior al conjugado CL2E, tuvo que considerarse algún otro factor que afectaría a la eficacia de CL2E. Una posible explicación es que el diseño del enlazador en CL2E-SN-38 deja la posición 20 del fármaco no derivatizada, haciendo que el grupo de lactona sea susceptible a la apertura del anillo. De hecho, los estudios con irinotecán han demostrado que la fuerza de SN-38 se ve disminuida por diversos factores, con el anillo de lactona abriéndose a la forma de carboxilato que posee sólo el 10 % de la fuerza de la forma de lactona intacta. Por el contrario, el SN-38 ligado a CL2A se derivatiza en la posición hidroxilo 20, un proceso que, en las camptotecinas, estabiliza el grupo de la lactona en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, es probable que el anillo de lactona de SN-38 esté protegido de la escisión en el CL2A, pero no el conjugado CL2E. Por tanto, la desestabilización del anillo de lactona podría haber contribuido a la disminución de la eficacia de CL2E *in vivo*. Dado que los estudios de estabilidad *in vitro* y el análisis de estabilidad en suero se realizaron en condiciones de acidez, no tenemos una medida directa de la forma de carboxilato de SN-38 en ninguno de estos conjugados.

En conclusión, los resultados *in vitro* e *in vivo* indican que el conjugado de milatuzumab-doxorrubicina es superior al conjugado de CL2A-SN-38 en la línea celular de linfoma de Raji, lo que puede reflejar la estabilidad mejorada del conjugado de doxorrubicina en comparación con la de CL2A. Sin embargo, el hallazgo de que el conjugado de CL2A-SN-38 era más eficaz que el conjugado de CL2E-SN-38 sumamente estable, sugiere que otros problemas, posiblemente relacionados con la activación del fármaco o con las sensibilidades de la línea celular, pueden estar en juego.

CD74 tiene múltiples funciones en la biología celular; en células presentadoras de antígenos, puede tener una función más dominante en el procesamiento de péptidos antigénicos, donde se encuentran los tumores sólidos, su función podría estar más relacionada con la supervivencia. Estas diferentes funciones podrían influir sobre el procesamiento y el tránsito intracelular. De manera alternativa, la menor eficacia del SN-38 ligado a CL2E podría reflejar la inactivación del fármaco por la apertura del anillo de lactona en SN-38, implicando la importancia del enlazador específico. Por último, en los modelos de tumores sólidos, la accesibilidad del antígeno parece tener un papel dominante en la

definición de la fuerza de milatuzumab-CL2A-SN-38 cuando se mide frente a la de conjugados preparados con otros anticuerpos internalizantes (hRS7) o poco internalizantes (hMN15) que eran más accesibles (expresados en la superficie) y abundantes. Sospechamos que este hallazgo es universal para las terapias dirigidas, pero estos estudios han demostrado al menos que las propiedades de internalización exclusivas de un agente dirigido a CD74 pueden proporcionar una eficacia significativa incluso cuando la expresión en la superficie del antígeno diana es mínima.

#### **Ejemplo 7. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar el cáncer de colon metastásico refractivo a terapia (CCmR)**

La paciente era una mujer de 62 años con CCmR que originalmente presentó enfermedad metastásica en enero de 2012. Un par de semanas después del diagnóstico, se sometió a una colectomía transversa ileal laparoscópica como primera terapia y después recibió 4 ciclos de quimioterapia FOLFOX (leucovorina, 5-fluorouracilo, oxaliplatino) en un entorno neoadyuvante antes de la hepatectomía derecha en marzo de 2012 para extirpar las lesiones metastásicas del lóbulo derecho del hígado. A esto le siguió un régimen adyuvante de FOLFOX que se reanudó en junio de 2012, durante un total de 12 ciclos de FOLFOX. En agosto, el oxaliplatino se retiró del régimen debido al empeoramiento de la neurotoxicidad. Su último ciclo de 5-FU fue el 25/09/12.

La TC realizada en enero de 2013 mostró metástasis en el hígado. después, la paciente se evaluó como una buena candidata para incluirla en el estudio de investigación IMMU-132 (hRS7-CL2A-SN-38). En su historial médico, la comorbilidad incluye asma, diabetes mellitus, hipertensión, hipercolesterolemia, soplo cardíaco, hernia de hiato, hipotiroidismo, síndrome del túnel carpiano, glaucoma, depresión, síndrome de piernas inquietas y neuropatía. Su historial quirúrgico incluye ligadura de trompas (1975), tiroidectomía (1983), colecistectomía (2001), liberación del túnel carpiano (2008) y cirugía de glaucoma.

En el momento de registrarse en este ensayo clínico, su lesión diana era un tumor de 3,1 cm en el lóbulo izquierdo del hígado. Las lesiones inespecíficas incluían varias masas hipoatenuadas en el hígado. Su CEA (antígeno carcinoembrionario) basal era de 781 ng/m.

Después de que la paciente firmase el consentimiento informado, IMMU-132 se suministró mediante infusión, siguiendo una pauta de una vez a la semana durante 2 semanas consecutivas, con un descanso de una semana, constituyendo esto un ciclo de tratamiento. Estos ciclos se repetían según se tolerasen. La primera infusión de IMMU-132 (8 mg/kg) comenzó el 15 de febrero de 2013 y finalizó sin acontecimientos destacables. La paciente sintió náuseas (Grado 2) y cansancio (Grado 2) durante el transcurso del primer ciclo y ha continuado el tratamiento desde entonces sin mayores acontecimientos adversos. Notificó sobre alopecia y estreñimiento en marzo de 2013. La primera evaluación de respuesta realizada (después de 6 dosis) el 08/04/2013 mostró una reducción de la lesión diana en un 29 % mediante tomografía computarizada (TC). Su nivel de CEA disminuyó a 230 ng/ml el 25 de marzo de 2013. En la segunda evaluación de respuesta (después de 10 dosis) el 23 de mayo de 2013, la lesión diana se redujo en un 39 %, constituyendo así una respuesta parcial según los criterios RECIST (por las siglas del inglés *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*, criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos). La paciente ha estado siguiendo el tratamiento desde el 14/06/13, recibiendo 6 ciclos que constituían 12 dosis de hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132) a 8 mg/kg. Su salud general y sus síntomas clínicos mejoraron considerablemente desde que comenzó este tratamiento de investigación.

#### **Ejemplo 8. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar el cáncer de mama metastásico refractivo a terapia**

La paciente era una mujer de 57 años con cáncer de mama en estadio IV, triple negativo, (ER/PR negativo, HER-neu negativo), diagnosticado originalmente en 2005. Se sometió a una lumpectomía de su mama izquierda en 2005, seguido de ACT (antraciclina, ciclofosfamida y taxano) en dosis densas en un entorno adyuvante en septiembre de 2005. Después, la paciente recibió radioterapia, que finalizó en noviembre. La recidiva local de la enfermedad se identificó cuando la paciente palpó un bulto en la mama contralateral (derecha) a principios de 2012, y después fue tratada con quimioterapia con CMF (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo). Su enfermedad volvió a aparecer en el mismo año, con lesiones metastásicas en la piel de la pared torácica. Después, la paciente recibió un régimen de quimioterapia con carboplatino + TAXOL®, durante el cual se produjo trombocitopenia. Su enfermedad avanzó y comenzó a tratarse con doxorubicina semanal, que continuó durante 6 dosis. La dermatosis también continuó avanzando. Una exploración FDG-TEP (tomografía de emisión positrónica con FDG (fluorodesoxiglucosa)) realizada el 26/09/12, mostró un avance de la enfermedad en la pared torácica y ganglios axilares agrandados y sólidos. La paciente recibió oxycodona para controlar el dolor.

Cuando la lesión de la pared torácica se abrió y sangró, se la administró IXEMPRA® desde octubre de 2012 hasta febrero de 2013 (cada 2 semanas durante 4 meses). Después la pusieron XELODA®, que no fue bien tolerado debido a la neuropatía en sus manos y pies, así como al estreñimiento. Las lesiones de la piel eran progresivas y después se la incluyó en el ensayo clínico IMMU-132 tras dar su consentimiento informado. La paciente también tenía un historial médico de hipertiroidismo y alteraciones visuales, con alto riesgo de enfermedad del SNC (sin embargo, la RM (resonancia magnética) cerebral fue negativa para la enfermedad del SNC). En el momento de inscribirse en este ensayo clínico, sus lesiones cutáneas (diana) en la mama derecha medían 4,4 cm y 2,0 cm en el diámetro mayor. Tenía otra lesión no diana en la mama derecha y un ganglio linfático agrandado en la axila derecha e izquierda.

La primera infusión de IMMU-132 (12 mg/kg), que la paciente toleró bien, comenzó el 12 de marzo de 2013. Su

segunda infusión se retrasó debido a una reducción de Grado 3 de la cifra absoluta de neutrófilos (ANC, *absolute neutrophil count*) (0,9) en el día programado de la infusión, una semana más tarde. Después de una semana de retraso y después de recibir NEULASTA®, se la administró su segundo IMMU-132, con una reducción de la dosis del 25 % a 9 mg/kg. A partir de entonces, ha estado recibiendo IMMU-132 según la pauta establecida en el protocolo, una vez a la semana durante 2 semanas, con una semana de descanso. Su primera evaluación de respuesta el 17 de mayo de 2013, después de 3 ciclos de terapia, mostró una disminución del 43 % en la suma del diámetro largo de las lesiones diana, constituyendo una respuesta parcial según los criterios RECIST. La paciente continúa el tratamiento con la dosis de 9 mg/kg. Su salud general y sus síntomas clínicos mejoraron considerablemente desde que comenzó el tratamiento con IMMU-132.

**Ejemplo 9. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar cáncer de pulmón no microcítico metastásico, resistente**

Este es un hombre de 60 años diagnosticado de cáncer de pulmón no microcítico. El paciente recibe regímenes de quimioterapia de carboplatino, bevacizumab durante 6 meses y muestra una respuesta, y a continuación, después de mejorar, recibe ciclos adicionales de quimioterapia con carboplatino, etopósido, TAXOTERE®, gemcitabina durante los 2 años siguientes, con respuestas ocasionales que no duran más de 2 meses. A continuación, el paciente presenta una masa mediastínica izquierda de 6,5 x 4 cm y derrame pleural.

Después de firmar el consentimiento informado, el paciente recibe IMMU-132 a una dosis de 18 mg/kg cada dos semanas. Durante las dos primeras inyecciones, aparecen períodos cortos de neutropenia y diarrea con 4 evacuaciones intestinales en 4 horas, pero al cabo de 2 días estos se solucionan o responden a los medicamentos sintomáticos. Después de un total de 6 infusiones de IMMU-132, la evaluación por TC de la lesión indicadora muestra una reducción del 22 %, justo por debajo de una respuesta parcial pero una reducción tumoral definida. El paciente continúa con esta terapia durante otros dos meses, cuando se observa por TC una respuesta parcial de reducción del tumor del 45 % de la suma de los diámetros de la lesión indicadora, constituyendo así una respuesta parcial según los criterios RECIST.

**Ejemplo 10. Uso de hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132) para tratar cáncer de pulmón microcítico metastásico, resistente**

Esta es una mujer de 65 años con un diagnóstico de cáncer de pulmón microcítico, que involucra su pulmón izquierdo, los ganglios linfáticos mediastínicos e indicios por RM de una metástasis en el lóbulo cerebral parietal izquierdo. La quimioterapia anterior incluía carboplatino, etopósido y topotecán, pero sin observarse respuesta. La radioterapia tampoco logra controlar su enfermedad. La paciente recibe IMMU-132 a una dosis de 18 mg/kg una vez cada tres semanas durante un total de 5 infusiones. Después de la segunda dosis, la paciente padece hipotensión y neutropenia de Grado 2, que mejoran antes de la siguiente infusión. Después de la quinta infusión, un estudio por TC muestra una reducción del 13 % de su masa diana en el pulmón izquierdo. La resonancia magnética del cerebro también muestra una reducción del 10 % de esta metástasis. La paciente continúa con la dosis de IMMU-132 cada 3 semanas durante otros 3 meses y continúa mostrando una mejora objetiva y subjetiva de su afección, con una reducción del 25 % de la masa en el pulmón izquierdo y una reducción del 21 % de la metástasis cerebral.

**Ejemplo 11. Tratamiento de un paciente con cáncer gástrico con enfermedad metastásica en estadio IV con hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132)**

Este paciente es un hombre de 60 años con antecedentes de tabaquismo y periodos de ingesta excesiva de alcohol durante un periodo de 40 años. Pierde peso, padece molestias y dolor al comer que no se alivian con antiácidos, dolor abdominal frecuente, lumbalgia, y más recientemente, ganglios palpables en ambas axilas. Busca consejo médico y, después de una evaluación diagnóstica basada en una biopsia a través de un gastroscopio, se verifica que tiene un adenocarcinoma, incluyendo algunas características escamosas en la unión gastroesofágica. Los estudios radiológicos (TC y FDG-TEP) también revelan enfermedad metastásica en la axila derecha e izquierda, en la región mediastínica, columna lumbar e hígado (2 tumores en el lóbulo derecho y 1 en el izquierdo, midiendo todos ellos entre 2 y 4 cm de diámetro). Se reseca su tumor gástrico y a continuación se le administra un ciclo de quimioterapia con epirrubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo. Después de 4 meses y un periodo de descanso de 6 semanas, teniendo en cuenta la progresión confirmada a través de las mediciones de la TC de los tumores metastásicos y algún deterioro general, se le cambia a quimioterapia con docetaxel, que tampoco logra controlar su enfermedad.

El paciente recibe después terapia con IMMU-132 (hRS7-CL2A-SN-38) a una dosis de 10 mg/kg infundidos en semanas alternas durante un total de 6 dosis, después de lo cual se realizan estudios de TC para evaluar el estado de su enfermedad. El paciente toleró bien estas infusiones, con algunas náuseas y diarrea leves, controladas con medicamentos sintomáticos. Los estudios por TC revelan que la suma de sus lesiones metastásicas indicadoras ha disminuido en un 28 %, por lo que continúa con esta terapia durante otros 5 ciclos. Los estudios de seguimiento por TC muestran que la enfermedad permanece reducida en un 35 % según los criterios RECIST de sus mediciones basales antes de la terapia con IMMU-132, y su estado general también parece haber mejorado, recuperando el paciente una actitud optimista hacia el control de su enfermedad.

**Ejemplo 12. Terapia de pacientes con cáncer de colon avanzado resistente a quimioinmunoterapia anterior, utilizando solo IMMU-130 (labetuzumab-CL2A-SN-38)**

El paciente era un hombre de 50 años con antecedentes de cáncer de colon metastásico en estadio IV, diagnosticado por primera vez en 2008 y sometido a una colectomía y hepatectomía parcial para los cánceres de colon primario y metastásico, respectivamente. Después, recibió quimioterapia, como se indica en la FIG. 8, que incluía irinotecán, oxaliplatino, FOLFIRINOX (5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, oxaliplatino) y bevacizumab, así como bevacizumab combinado con 5-fluorouracilo/leucovorina, durante casi 2 años. Posteriormente, recibió ciclos de cetuximab, ya sea solo o combinado con quimioterapia FOLFIRI (leucovorina, 5-fluorouracilo, irinotecán) durante el próximo año o más. En 2009, recibió terapia de ablación por radiofrecuencia para su metástasis hepática mientras estaba bajo quimioinmunoterapia, y a fines de 2010 se sometió a una resección en cuña de sus metástasis pulmonares, que se repitió unos meses después, a principios de 2011. A pesar de recibir quimioinmunoterapia en 2011, a finales de 2011, y en 2012, aparecieron nuevas metástasis pulmonares, observándose metástasis tanto en el pulmón como en el hígado. Su título de antígeno carcinoembrionario (CEA) plasmático basal fue de 12,5 ng/ml justo antes de someterse a la terapia de anticuerpo-fármaco con IMMU-130. Las lesiones indicadoras elegidas por el radiólogo para medir el cambio de tamaño del tumor mediante tomografía computarizada, fueron el lóbulo medio del pulmón derecho y las metástasis hepáticas, ambos con una suma total de 91 mm de sus diámetros más largos al inicio antes de la terapia con IMMU-130 (anti-CEACAM5-CL2A-SN-38).

Este paciente recibió dosis de 16 mg/kg de IMMU-130 mediante infusión IV lenta cada dos semanas durante un total de 17 dosis de tratamiento. El paciente toleró bien la terapia, teniendo sólo náuseas de grado 1, diarrea y cansancio después del primer tratamiento, que se produjeron después de los tratamientos 4 y 5, pero no después, porque recibió medicación para estos efectos secundarios. Después del tratamiento 3, mostró alopecia (grado 2), que estuvo presente durante la terapia posterior. Las náuseas, la diarrea y los vómitos ocasionales, duraron solo 2-3 días, y su cansancio después de la primera infusión duró 2 semanas. De otra manera, el paciente toleró bien la terapia. Debido a la larga duración de recibir este anticuerpo humanizado (injertado con CDR) conjugado con SN-38, se analizó su sangre para detectar anticuerpos anti-labetuzumab, y no se detectó ninguno, incluso después de 16 dosis.

Las primeras mediciones de tomografía computarizada (TC) se realizaron después de 4 tratamientos y mostraron un cambio del 28,6 % con respecto a la suma de las mediciones realizadas al inicio del estudio, antes de esta terapia, en las lesiones indicadoras. Después de 8 tratamientos, esta reducción se convirtió en un 40,6 %, constituyendo así una remisión parcial según los criterios RECIST. Esta respuesta se mantuvo durante otros 2 meses, cuando sus mediciones por TC indicaron que las lesiones indicadoras eran un 31,9 % más bajas que las mediciones basales, pero algo más altas que la disminución anterior del 40,6 % medida. Por tanto, basándose en cuidadosas mediciones por TC de las lesiones indicadoras en el pulmón y el hígado, este paciente, cuya quimioterapia e inmunoterapia anteriores habían fracasado, incluyendo el irinotecán (molécula precursora de SN-38), mostró una respuesta objetiva al metabolito activo de irinotecán (o camptotecin), SN-38, cuando se dirigió a través del anticuerpo humanizado anti-CEACAM5, labetuzumab (hMN-14). Fue sorprendente que aunque el irinotecán (CPT-11) actúa liberando SN-38 *in vivo*, el anticuerpo anti-CEACAM5 conjugado con SN-38, demostró ser eficaz en un paciente con cáncer colorrectal al inducir una respuesta parcial después de que el paciente no respondiera anteriormente a su última terapia con irinotecán. La reducción del título de CEA en el plasma del paciente también corroboró los hallazgos por TC: descendió desde el nivel basal de 12,6 ng/ml a 2,1 ng/ml después de la tercera dosis de terapia, y estuvo entre 1,7 y 3,6 ng/ml entre las dosis 8 y 12. Se considera que el título normal de CEA en plasma está habitualmente entre 2,5 y 5,0 ng/ml, por lo que esta terapia efectuó una normalización de su título de CEA en la sangre.

**Ejemplo 13. Terapia con IMMU-130 de un paciente con cáncer de colon avanzado**

Esta paciente es una mujer de 75 años diagnosticada inicialmente de cáncer de colon metastásico (estadio IV). A la paciente se le realiza una hemicolectomía parcial derecha y una resección de su intestino delgado y después recibe terapias de FOLFOX, FOLFOX + bevacizumab, FOLFIRI + ramucirumab y FOLFIRI + cetuximab, durante un año y medio, cuando muestra avance de la enfermedad, con propagación de la enfermedad al fondo de saco posterior, epiplón, con ascitis en su pelvis y un derrame pleural en el lado derecho de su cavidad torácica. Su título de CEA basal justo antes de recibir esta terapia era de 15 ng/ml. La paciente recibe 6 mg/kg de IMMU-130 (anti-CEACAM5-CL2A-SN-38) dos veces por semana durante 2 semanas consecutivas, y después una semana de descanso (ciclo de 3 semanas), durante más de 20 dosis, que la paciente toleró muy bien, sin mayores toxicidades hematológicas o no hematológicas. A los 2 meses de la terapia, su título de CEA en plasma se redujo moderadamente a 1,3 ng/ml, pero en la evaluación de 8 semanas muestra una reducción del 21 % de las lesiones tumorales indicadoras, que aumenta a una reducción del 27 % a las 13 semanas. Sorprendentemente, tanto la ascitis como el derrame pleural de la paciente disminuyeron (desapareciendo este último) en este momento, mejorando así notablemente el estado general de la paciente. La paciente continúa su terapia de investigación.

**Ejemplo 14. Paciente con cáncer gástrico con enfermedad metastásica en estadio IV tratado con IMMU-130**

El paciente es un hombre de 52 años que acude al médico por molestias gástricas y dolor relacionado con la alimentación desde hace unos 6 años y con pérdida de peso durante los últimos 12 meses. La palpación de la zona del estómago revela un bulto duro que después se explora con una gastroscopia, revelando una masa ulcerosa en la parte inferior de su estómago. Este se biopsia y diagnostica como un adenocarcinoma gástrico. Las pruebas de

laboratorio no revelan cambios anómalos específicos, salvo que en las pruebas de función hepática, la LDH y el CEA estaban elevados, siendo este último de 10,2 ng/ml. Después, el paciente se sometió a una exploración TEP (tomografía de emisión positrónica) de todo el cuerpo, que reveló, además del tumor gástrico, enfermedad metastásica en la axila izquierda y en el lóbulo derecho del hígado (2 pequeñas metástasis). Al paciente se le reseca el tumor gástrico y después se realizan mediciones de TC basales de sus tumores metastásicos. Cuatro semanas después de la cirugía, el paciente recibe 3 ciclos de quimioterapia combinada que consisten en un régimen de cisplatino y 5-fluorouracilo (CF), pero no lo tolera bien, por lo que se cambia a un tratamiento con docetaxel. Basándose en las exploraciones por TC, parece que la enfermedad se estabiliza durante aproximadamente 4 meses, pero después, los síntomas de la paciente de mayor pérdida de peso, dolor abdominal, pérdida de apetito y cansancio extremo, hace que se tengan que repetir los estudios de TC, que muestran un aumento de tamaño de las metástasis a una suma del 20 % y una lesión sospechosa en el lugar de la resección gástrica original.

Posteriormente, el paciente recibe terapia experimental con IMMU-130 (anti-CEACAM5-CL2A-SN-38) siguiendo una pauta semanal de 8 mg/kg. El paciente tolera bien esto, pero después de 3 semanas muestra una neutropenia de grado 2 y diarrea de grado 1. Su cuarta infusión se pospone una semana y después se reinstituyen las infusiones semanales, sin indicios de diarrea ni neutropenia durante las 4 inyecciones siguientes. Posteriormente, el paciente se somete a un estudio por TC para medir el tamaño de su tumor metastásico y observar la zona original de la resección gástrica. El radiólogo mide, según los criterios RECIST, una disminución de la suma de las lesiones metastásicas, en comparación con el valor basal antes de la terapia con IMMU-130, del 23 %. No parece haber ninguna lesión clara en la zona de la resección gástrica original. En este momento, el título de CEA del paciente es de 7,2 ng/ml, que es muy inferior al valor basal previo a la terapia con IMMU-130 de 14,5 ng/ml. El paciente continúa con terapia semanal de IMMU-130 a la misma dosis de 8,0 mg/kg, y después de un total de 13 infusiones, sus estudios por TC muestran que una metástasis hepática ha desaparecido y que la suma de todas las lesiones metastásicas se ha reducido en un 41 %, constituyendo una respuesta parcial según los criterios RECIST. El estado general del paciente mejora y reanuda sus actividades normales mientras continúa recibiendo una terapia de mantenimiento de 8 mg/kg de IMMU-130 cada tres semanas durante otras 4 inyecciones. En la última medición de CEA en sangre, el valor es de 4,8 ng/ml, que está dentro del intervalo normal de un fumador, que es el caso de este paciente.

#### **Ejemplo 15. Terapia con hMN-15-CL2A-SN-38 de cáncer de mama metastásico triple negativo recidivante**

Una mujer de 58 años con cáncer de mama metastásico triple negativo, anteriormente tratada con bevacizumab y paclitaxel, sin respuesta, presenta metástasis en varias costillas, en las vértebras lumbares, y una lesión solitaria de 3 cm de diámetro en su pulmón izquierdo, con considerable osteodinia y cansancio. La paciente recibe una terapia experimental con el anticuerpo monoclonal humanizado anti-CEACAM6, IgG hMN-15, conjugado con 6 moléculas de SN-38 por IgG. Como ciclo de terapia, la paciente recibe una infusión de 12 mg/kg cada tres semanas, que se repite durante 4 dosis. Salvo neutropenia transitoria de grado 2 y alguna diarrea inicial, tolera bien la terapia, que luego se repite, después de un descanso de 2 meses, durante otro ciclo. El examen radiológico indica que tiene una respuesta parcial según los criterios RECIST, porque la suma de los diámetros de las lesiones indicadoras disminuye en un 39 %. Su estado general, incluyendo la osteodinia, también mejora y vuelve a casi el mismo nivel de actividad que tenía antes de su enfermedad.

#### **Ejemplo 16. Terapia con hMN-15-SN-38 de carcinoma de colon metastásico recidivante, generalmente refractivo**

Una mujer de 46 años padece cáncer de colon metastásico en estadio IV, con historial médico anterior de resección de la lesión primaria que también tenía metástasis hepáticas sincrónicas en ambos lóbulos del hígado, así como un solo foco de propagación al pulmón derecho; estas metástasis se midieron mediante TC obteniéndose un tamaño entre 2 y 5 cm de diámetro. Durante un período de 3 años, la paciente se sometió a varios ciclos de quimioterapia, que incluían 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, oxaliplatino, cetuximab y bevacizumab. En dos ocasiones, hubo indicios de estabilización de la enfermedad o una respuesta a corto plazo, pero sin reducción del 30 % o más de sus lesiones medidas. Su título de CEA en plasma al inicio del estudio antes de la terapia con hMN-15-CL2A-SN-38 era de 46 ng/ml y sus lesiones indicadoras totales median una suma de 92 mm.

La terapia con hMN-15-CL2A-SN-38 se instituye a 12 mg/kg semanalmente durante 2 semanas, con un período de descanso de una semana a partir de entonces, dentro de un ciclo de 21 días. Este ciclo se repite 3 veces, con neutropenia transitoria y efectos secundarios gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea). Sorprendentemente, a pesar de no responder a la terapia con FOLFIRI (que incluye irinotecán o CPT-11), la paciente mostró una respuesta parcial según los criterios RECIST después de finalizar su terapia. A continuación, la paciente siguió una pauta de mantenimiento de esta terapia a una dosis de 16 mg/kg una vez al mes durante los 6 meses siguientes. Las exploraciones de seguimiento muestran que su enfermedad permanece bajo control como una respuesta parcial (RP), y la paciente generalmente se encuentra en buenas condiciones con un estado de rendimiento de Kaaarnofsky del 90 %.

#### **Ejemplo 17. Paciente con cáncer de colon con enfermedad metastásica en estadio IV tratado con conjugado anti-CSAp-SN-38**

Este paciente presenta metástasis de cáncer de colon en el lóbulo izquierdo del hígado y en ambos pulmones, después de una resección de un adenocarcinoma de colon sigmoide de 9 cm, seguido de quimioinmunoterapia con FOLFIRI y cetuximab durante 6 meses, y después FOLFOX seguido de bevacizumab durante un período adicional de

aproximadamente 9 meses. Diez meses después de la resección inicial y después de comenzar la terapia, la enfermedad estable que se cree que está presente, muestra una progresión por el crecimiento de las lesiones y la aparición de una nueva metástasis en la glándula suprarrenal izquierda. Su CEA en plasma en este momento es de 52 ng/ml y su estado general parece haberse deteriorado, con dolores abdominales, cansancio y anemia límite, sugiriendo posiblemente hemorragia interna.

Como ciclo de tratamiento, la paciente recibe ahora, semanalmente, durante dos semanas, un conjugado CL2A-SN-38 de anticuerpo hMu-9 (anti-CSAp) a una dosis de 12 mg/kg, con una semana de descanso y después se repite durante ciclos de tratamiento adicionales, realizándose un hemograma semanal y recibiendo medicación de atropina para las reacciones gastrointestinales. Después del primer ciclo de tratamiento, se observa alopecia de Grado 2, pero solo una neutropenia de Grado 1. Después de 3 ciclos de tratamiento, su título de CEA en plasma se redujo a 19 ng/ml, y en este momento, sus mediciones por TC muestran una disminución del 24,1 % de las lesiones indicadoras en el hígado y los pulmones. Después de 3 ciclos de terapia adicionales, la paciente muestra una reducción en la TC de las lesiones indicadoras del 31,4 % y una disminución del tamaño de la masa suprarrenal en un 40 % aproximadamente. Se considera que esta paciente responde a la terapia de fármaco-anticuerpo anti-CSAp-CL2A-SN-38 y continúa con esta terapia. Su estado general parece mejorar, con menos cansancio, sin dolor ni molestias abdominales y, en general, más energía.

#### **Ejemplo 18. Tratamiento de cáncer de mama con el inmunocombinado anti-CEACAM6-CL2A-SN-38**

Esta paciente padece cáncer de mama metastásico triple negativo (no expresa receptores de estrógeno ni de progesterona ni Her2/neu) que después de varias terapias diferentes durante los últimos 3 años presenta recidiva. La paciente presenta varios tumores pequeños en ambos pulmones, así como metástasis en sus vértebras C4, C5, T2 y T3, y bilateralmente en varias costillas. La paciente está bajo terapia estándar para sus lesiones osteolíticas y ahora comienza el tratamiento con hMN-15-CL2A-SN-38 a una dosis de 16 mg/kg una vez a la semana durante 3 semanas, con una pausa de una semana, y después reanuda esta terapia de ciclo de 3 semanas dos veces más. Dos semanas después de la terapia, se realizaron exploraciones por TC para evaluar la respuesta, y se observa que 2 de las metástasis pulmonares pequeñas han desaparecido, mientras que 1 de las lesiones más grandes parece haber disminuido en aproximadamente un 40 %. Todavía hay metástasis en las vértebras, pero las lesiones en C4 y C5 parecen más pequeñas en aproximadamente un 25 %. De las metástasis en las costillas, 2 de 6 lesiones pequeñas parecen tener un tamaño mucho más reducido y no se sabe con certeza si son viables o pequeñas zonas de cicatrización o necrosis. Los marcadores tumorales de la paciente, así como sus títulos de LDH, parecen mostrar niveles estables o reducidos, lo que indica que el avance de la enfermedad se ha detenido y que también hay algún indicio de reducción de la enfermedad. Subjetivamente, el paciente se siente mucho mejor, se cansa menos, su osteodinia disminuyó y respira mejor. Después de cada terapia, la paciente tuvo algunas náuseas y vómitos sin importancia, que se solucionaron al cabo de una semana. El único otro efecto secundario fue una trombocitopenia transitoria, que también se solucionó al cabo de 7 días. La paciente está en observación y a los 2 meses reanuda los ciclos de terapia.

#### **Ejemplo 19. Tratamiento de cáncer de colon metastásico con una combinación de inmunocombinados anti-CEACAM5 y anti-CEACAM6-CL2A-SN-38**

Este paciente padece cáncer de colon metastásico, con indicios de enfermedad en el hígado (lesión de 5 cm en el lóbulo derecho y lesión de 3 cm en el lóbulo izquierdo) mediante TC, así como 2 metástasis (de 2 y 3 cm de tamaño) en el pulmón derecho. El cáncer primario de colon se resecó anteriormente y el paciente tuvo ciclos de terapia postoperatoria debido a metástasis metacrónicas en el hígado y los pulmones. Durante la terapia, las metástasis del hígado crecieron y la metástasis de un pulmón se convierte en dos, por lo que el paciente es candidato a quimioinmunoterapia experimental. Después, inicia un ciclo de conjugados dobles de anticuerpo-fármaco, labetuzumab (hMN-14)-CL2A-SN-38 y hMN-15-CL2A-SN-38, cada uno de ellos administrado en días alternos a dosis de 8 mg/kg, una vez a la semana durante 2 semanas y después se repite mensualmente durante 4 meses. Dos semanas después de la terapia, el estado del paciente se evalúa mediante TC y pruebas analíticas. Las exploraciones por TC revelan que el tumor grande del lóbulo hepático derecho se reduce en un 50 %, el tumor del lóbulo izquierdo en aproximadamente un 33 % y las metástasis pulmonares en aproximadamente un 20 % acumulativo para ambos tumores. Su título de CEA en sangre disminuye de 22 ng/ml al inicio de la terapia a 6 ng/ml en esta revisión. Subjetivamente, el paciente afirma que se siente más fuerte y también que parece tener más energía a la hora de realizar las actividades diarias. Los efectos secundarios son trombocitopenia y leucopenia transitorias, volviendo a intervalos normales al cabo de 2 semanas después de la terapia, y diversos episodios de náuseas y vómitos, controlados con medicamentos antieméticos. Está previsto que el paciente reanude estos ciclos de terapia en aproximadamente 2 meses, después de otra evaluación diagnóstica de la patología.

#### **Ejemplo 20. Infusión continua de conjugados de anticuerpo-fármaco**

Anteriormente, a la paciente se le había resecado un carcinoma rectal y recibía radioquimioterapia pre y postoperatoria según el tratamiento convencional. La paciente no presentó tumores durante cuatro años, pero ahora presenta 3 pequeñas lesiones metastásicas en el lóbulo hepático derecho, descubiertas mediante TC periódica y valores de seguimiento de CEA en sangre, que se elevan a 6,3 ng/ml desde los 3,0 ng/ml posteriores a la terapia inicial. A la paciente se le coloca un catéter permanente y recibe una infusión continua de labetuzumab-CL2A-SN-28 a una dosis

de 2 mg/kg durante 17 días. A continuación recibe una terapia de infusión continua repetida 5 semanas después, ahora durante 3 semanas, a 1 mg/kg. Tres semanas más tarde, las exploraciones por TC y el control de CEA en sangre, revelan que 1 de las metástasis hepáticas ha desaparecido y que las otras dos son iguales o ligeramente más pequeñas. El título de CEA en sangre ahora es de 2,4 ng/ml. Durante el tratamiento, la paciente no presenta síntomas y solo padece náuseas y vómitos de grado 2 así como neutropenia de grado 2, solucionándose ambas cosas con el paso del tiempo.

#### **Ejemplo 21. Terapia de cáncer de colon metastásico avanzado con el inmunocombinado anti-CEACAM5**

El paciente es un hombre de 50 años cuyas terapias anteriores para el cáncer de colon metastásico habían fracasado. La primera línea de terapia es FOLFIRINOX + AVASTIN® (desarrollada gradualmente) comenzando con IROX (Irinotecán + Oxaliplatino) en el primer ciclo. Tras iniciar este tratamiento, la TC del paciente muestra una disminución del tamaño de las metástasis hepáticas. A esto le sigue una cirugía para extirpar el tejido tumoral. La quimioterapia antineoplásica posquirúrgica es una continuación del régimen de primera línea (sin la parte de IROX) que condujo a un período transitorio sin recidiva. Después de un intervalo de aproximadamente 1 año, una TC revela la recidiva de las metástasis hepáticas. Esto conduce al inicio del régimen de segunda línea (FOLFIRI + Cetuximab). Otra TC muestra una respuesta en las metástasis hepáticas. Después se realiza la ablación por RF de las metástasis hepáticas, seguido de la continuación de la quimioterapia antineoplásica posquirúrgica con FOLFIRINOX + Cetuximab, seguido del mantenimiento con Cetuximab durante aproximadamente un año. Otra TC no muestra indicios de enfermedad. Una exploración adicional muestra posibles nódulos pulmonares que se confirman. Esto conduce a una resección en cuña de los nódulos pulmonares. Posteriormente se reinicia y se continúa con FOLFIRI + Cetuximab. Las exploraciones posteriores mediante TC muestran metástasis tanto en el pulmón como en el hígado.

En el momento de la administración del inmunocombinado hMN-14-CL2A-SN-38, el paciente tiene cáncer de colon metastásico avanzado, con metástasis tanto en el pulmón como en el hígado, que no responden al irinotecán (camptotecina). El inmunocombinado hMN-14-CL2A-SN-38 se administra a una dosis de 12 mg/kg, que se repite cada dos semanas. El paciente muestra una respuesta parcial con reducción de tumores metastásicos según los criterios RECIST.

Cabe destacar que solo un paciente de esta cohorte de 12 mg/kg (administrados cada dos semanas) muestra valores hematológicos de grado 2 (neutropenia) y la mayoría de los pacientes tienen náuseas, vómitos o alopecia de grado 1 o 2, que son signos de la actividad del conjugado anticuerpo-fármaco, pero bien tolerados. El efecto de la fracción de anticuerpo en la mejora del direccionamiento de la camptotecina explica la eficacia de la fracción SN-38 en el cáncer que anteriormente había sido resistente al irinotecán no conjugado.

#### **Ejemplo 22. Tratamiento de cáncer pancreático metastásico con el inmunocombinado anti-MUC5ac-CL2A-SN-38**

Este paciente de 44 años tiene antecedentes de carcinoma pancreático metastásico, con adenocarcinoma ductal de páncreas inoperable en la cabeza del páncreas y muestra metástasis en los lóbulos izquierdo y derecho del hígado, midiendo el primero 3 x 4 cm y el segundo 2 x 3 cm. El paciente recibe un ciclo de gemcitabina pero no muestra ninguna respuesta objetiva. Cuatro semanas después, el paciente recibe hPAM4-CL2A-SN-38 i.v. a una dosis de 8 mg/kg dos veces por semana durante 2 semanas, con una semana de descanso y después se repite durante otros 2 ciclos. Una semana después se realizan estudios mediante TC y muestran una reducción total de la masa tumoral (en todos los sitios) del 32 % (respuesta parcial), junto con una disminución del título de CA19-9 en sangre de 220 al inicio del estudio a 75 en el momento de la evaluación radiológica. El paciente solo muestra náuseas y vómitos de grado 1 después de cada tratamiento con el conjugado anticuerpo-fármaco, y una neutropenia de grado 2 al final del último ciclo de tratamiento, que se solucionan 4 semanas después. No se administra ninguna premedicación para prevenir reacciones a la infusión.

#### **Ejemplo 23. Uso de hL243-CL2A-SN-38 para tratar cáncer de colon metastásico refractivo a terapia (CCmR)**

El paciente es un hombre de 67 años que presenta cáncer de colon metastásico. Después de una colectomía transversal poco después del diagnóstico, el paciente recibe 4 ciclos de quimioterapia FOLFOX en un entorno neoadyuvante antes de la hepatectomía parcial para extirpar las lesiones metastásicas en el lóbulo izquierdo del hígado. A esto le siguió un régimen adyuvante de FOLFOX durante un total de 10 ciclos de FOLFOX.

La TC muestra metástasis en el hígado. Su lesión diana es un tumor de 3,0 cm en el lóbulo izquierdo del hígado. Las lesiones inespecíficas incluían varias masas hipoatenuadas en el hígado. El CEA basal es de 685 ng/ml.

Después de que el paciente firme el consentimiento informado, se administra hL243-CL2A-SN-38 (10 mg/kg) cada dos semanas durante 4 meses. Después del primer tratamiento, el paciente padece náuseas (Grado 2) y cansancio (Grado 2) y continúa el tratamiento sin efectos adversos importantes. La primera evaluación de respuesta realizada (después de 8 dosis) muestra una reducción de la lesión diana de un 26 % por tomografía computarizada (TC) y su nivel de CEA disminuye a 245 ng/ml. En la segunda evaluación de respuesta (después de 12 dosis), la lesión diana se redujo en un 35 %. Su salud general y sus síntomas clínicos mejoraron considerablemente.

**Ejemplo 24. Tratamiento de linfoma folicular recidivante con IMMU-114-CL2A-SN-38 (anti-HLA-DR-SN-38)**

Después de recibir quimioterapia R-CHOP para el linfoma folicular que presenta enfermedad extendida en varios ganglios linfáticos regionales (cervical, axilar, mediastínico, inguinal, abdominal) y afectación medular, este hombre de 68 años recibe el agente de experimentación, IMMU-114-CL2A-SN-38 (anti-HLA-DR-CL2A-SN-38) a una dosis de 10 mg/kg semanalmente durante 3 semanas, con un descanso de 3 semanas, y después un segundo ciclo durante otras 3 semanas. El paciente se evaluó después con respecto a cambios en las lesiones tumorales indicadoras mediante TC, y muestra una reducción del 23 % según los criterios de CHESON. La terapia se repite durante otros 2 ciclos, mostrando después una reducción del tumor de 55 % mediante TC, que es una respuesta parcial.

**Ejemplo 25. Tratamiento de leucemia linfocítica crónica recidivante con IMMU-114-CL2A-SN-38**

El paciente es un hombre de 67 años con antecedentes de LLC, según lo definido por el International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia and World Health Organization classifications, que presenta enfermedad recidivante después de tratamientos anteriores con fludarabina, dexametasona y rituximab, así como un régimen de CVP (sulfato de vincristina y prednisona). Ahora tiene fiebre y sudores nocturnos asociados a un aumento de tamaño generalizado de los ganglios linfáticos, una producción reducida de hemoglobina y plaquetas, así como un recuento leucocitario en rápido aumento. Su LDH está elevada y la beta-2-microglobulina es casi el doble de lo normal. El paciente recibe terapia con conjugado IMMU-114-CL2A-SN-38 a una pauta de dosificación de 8 mg/kg semanalmente durante 4 semanas, con un descanso de 2 semanas, y después, el ciclo se repite nuevamente. La evaluación muestra que los parámetros hematológicos del paciente están mejorando y que el número de sus células de LLC circulantes parece estar disminuyendo. Después, la terapia se reanuda durante otros 3 ciclos, tras lo cual sus valores hematológicos y analíticos indican que tiene una respuesta parcial.

**Ejemplo 26. Uso de hMN-15-CL2A-SN-38 para tratar cáncer de pulmón no microcítico metastásico, resistente**

El paciente es un hombre de 58 años diagnosticado de cáncer de pulmón no microcítico. Inicialmente recibe regímenes de quimioterapia con carboplatino, bevacizumab durante 6 meses y muestra una respuesta, y a continuación, después de mejorar, recibe ciclos adicionales de quimioterapia con carboplatino, etopósido, TAXOTERE®, gemcitabina durante los 2 años siguientes, con respuestas ocasionales que no duran más de 2 meses. A continuación, el paciente presenta una masa mediastínica izquierda que mide 5,5 x 3,5 cm y derrame pleural.

Después de firmar el consentimiento informado, el paciente recibe hMN-15-CL2A-SN-38 a una dosis de 12 mg/kg cada dos semanas. Durante las dos primeras inyecciones, aparecen períodos cortos de neutropenia y diarrea pero al cabo de 2 días estos se solucionan o responden a los medicamentos sintomáticos. Después de un total de 6 infusiones de hMN-15-SN-38, la evaluación por TC de la lesión diana muestra una reducción del 22 %. El paciente continúa con esta terapia durante otros dos meses, cuando la TC detecta una respuesta parcial del 45 %.

**Ejemplo 27. Tratamiento de un paciente con linfoma folicular con hA19-CL2A-SN-38.**

El paciente es un hombre de 60 años que presenta dolor abdominal y una masa palpable. Al paciente se le han realizado estudios mediante TC y FDG-TEP que confirman la presencia de la masa con adenopatías patológicas en los ganglios mediastínicos, axilares y cervicales. Las pruebas analíticas son normales, exceptuando la LDH y la beta-2-microglobulina que están elevadas. La biopsia de médula ósea revela varios agregados linfoides paratrabeculares y perivasculares. Estos agregados son linfocíticos con expresión de CD20, CD19 y CD10 mediante inmunotinción. El diagnóstico final es linfoma folicular de grado 2, estadio IVA, con una puntuación en el FLIPI (por las siglas del inglés *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*, índice pronóstico internacional de linfoma folicular) de 4. El diámetro más largo del ganglio más grande involucrado es de 7 cm. El paciente recibe un anticuerpo monoclonal de IgG anti-CD 19 humanizado (hA19) conjugado con SN-38 (6 moléculas de fármaco por IgG) con un enlazador CL2A. La dosis es de 6 mg/kg a la semana durante 4 semanas consecutivas, con dos semanas de descanso y después ciclos repetidos de 4 semanas de tratamiento cada 6 semanas. Después de 5 ciclos, las evaluaciones de la médula ósea y las imágenes (TC) muestran una respuesta parcial, donde las lesiones medibles disminuyen en aproximadamente un 60 % y la médula ósea está mucho menos infiltrada. Además, los títulos de LDH y de beta-2-microglobulina también disminuyen.

**Ejemplo 28. Tratamiento de LLA recidivante de células B precursoras con hA19-CL2A-SN-38 Esta mujer de 51 años ha estado con terapia para LLA de células B precursoras negativa para el cromosoma Filadelfia, que muestra células de LLA teñidas para CD19,**

CD20, CD10, CD38 y CD45. Más del 20 % de los linfoblastos de médula ósea y sangre expresan CD 19 y CD20. La paciente ha recibido terapia anterior de clofarabina y citarabina, dando como resultado una toxicidad hematológica considerable, pero sin respuesta. También se inició un ciclo de citarabina (ara-C) a dosis altas, pero la paciente no pudo tolerarlo. La paciente recibió terapia con hA19-CL2A-SN-38 a dosis semanales mediante infusión de 6 mg/kg durante 5 semanas, y después, 2 semanas de descanso, repitiendo esta terapia dos veces más. Sorprendentemente, muestra mejora en su hemograma y medulograma, suficiente para determinar una respuesta parcial. Después de un descanso de 2 meses debido a la neutropenia (grado 3), la terapia se reanuda a 8 mg/kg cada dos semanas durante otros 4 ciclos. En ese momento, ha mejorado mucho y se está evaluando para una terapia de mantenimiento para tratar de llevarla a un estadio en el que pueda ser candidata para un trasplante de células madre.

**Ejemplo 29. Tratamiento del linfoma con el inmunoc conjugado anti-CD22-CL2A-SN-38**

El paciente es un hombre de 62 años con linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) recidivante. Después de 6 ciclos de quimioinmunoterapia R-CHOP, ahora presenta una extensa propagación de los ganglios linfáticos en los ganglios linfáticos mediastínicos, axilares e inguinales. El paciente recibe semanalmente × 3 epratuzumab-CL2A-SN-38 (anti-CD22) a una dosis de 12 mg/kg, con una semana de descanso, y después se repite de nuevo durante otros dos ciclos. Una semana más tarde, el paciente se evalúa por imágenes de TC, se mide el volumen total del tumor mostrando una disminución del 35 % (respuesta parcial), que parece mantenerse durante los 3 meses siguientes. Después de la terapia, los efectos secundarios son solo trombocitopenia y náuseas y vómitos de grado 1, que se solucionan al cabo de 2 semanas. Para reducir las reacciones a la infusión el paciente no recibe ninguna terapia anterior.

**Ejemplo 30. Terapia combinada de linfoma folicular con veltuzumab y epratuzumab-CL2A-SN-38 en un entorno de vanguardia.**

A una mujer de 35 años se la diagnostica un linfoma folicular de grado bajo y buena puntuación en el FLIPI, que se presenta en sus ganglios linfáticos cervicales, tanto en la axila como en el mediastino. Su bazo no está agrandado y la biopsia de médula ósea no revela afectación de la enfermedad. La paciente no está muy afectada sintomáticamente, solo con periodos de temperatura elevada, sudores nocturnos, y está algo más cansada de lo habitual. Su médico decide no llevar a cabo un proceso de observación y espera, sino ofrecer a esta mujer una terapia menos agresiva que combine un ciclo subcutáneo del anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado, veltuzumab, semanalmente × 4 semanas (200 mg/m<sup>2</sup>) combinado con dos ciclos semanales de epratuzumab-CL2A-SN-38 anti-CD22, siendo cada infusión una dosis de 8 mg/kg. Esta terapia combinada se repite 2 meses después, y a continuación la paciente se evalúa mediante estudios de imágenes de TC y FDG-TEP, así como mediante una biopsia de médula ósea. Sorprendentemente, se observa una reducción de aproximadamente el 90 % de toda la enfermedad, y después la paciente recibe otro ciclo de esta terapia combinada tras un descanso de 4 semanas. La evaluación 4 semanas después muestra una respuesta radiológica (y una biopsia de médula ósea) completa. Su médico decide repetir este ciclo de terapia 8 meses después, y las pruebas radiológicas/patológicas muestran una remisión completa prolongada.

**Ejemplo 31. Terapia de vanguardia de linfoma folicular utilizando veltuzumab-CL2A-SN-38**

La paciente es una mujer de 41 años que presenta linfoma folicular de grado bajo, con ganglios linfáticos cervicales y axilares bilaterales medibles (2-3 cm cada uno), una masa mediastínica de 4 cm de diámetro y agrandamiento del bazo. La paciente recibe 3 ciclos de terapia con veltuzumab-CL2A-SN-38 (anti-CD20-CL2A-SN-38), cada ciclo consiste en 10 mg/kg infundidos una vez cada 3 semanas. Después de finalizar la terapia, las mediciones de su tumor por TC muestran una reducción del 80 %. Posteriormente la paciente recibe 2 ciclos adicionales de terapia y las mediciones por TC indican que se obtiene una respuesta completa. Esto se confirma a través de imágenes FDG-TEP.

**Ejemplo 32. Terapia de LDCBG recidivante con el anticuerpo humanizado 1F5 conjugado con CL2A-SN-38**

Una mujer de 53 años presenta linfoma difuso de células B grandes recurrente en sitios paraaórticos mediastínicos y abdominales 8 meses después de mostrar una respuesta parcial a la quimioterapia R-CHOP administrada durante 6 ciclos. La paciente se niega a recibir más quimioterapia citotóxica, por lo que se la administra una terapia más suave que consiste en 10 mg/kg de anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado 1F5, conjugado con aproximadamente 6 moléculas de SN-28 por molécula de anticuerpo con enlazador CL2A, una vez a la semana cada dos semanas durante 5 infusiones. Los estudios mediante TC y FDG-TEP indican una reducción adicional de sus linfomas en un 40 %, así que después de un período de descanso de 4 semanas, la terapia se reanuda a una dosis de 8 mg/kg cada 3 semanas durante un total de 5 infusiones. La evaluación de su enfermedad revela una reducción de aproximadamente 80 %.

**Ejemplo 33. Terapia de leucemia linfocítica crónica recidivante con rituximab-CL2A-SN-38**

Un hombre de 62 años con antecedentes de 8 años de LLC, que en el pasado ha respondido a la terapia con fludarabina, ciclofosfamida y rituximab, y después tuvo una recaída con ibrutinib para una respuesta parcial que duró 9 meses, presenta enfermedad progresiva. El paciente recibe monoterapia con rituximab-CL2A-SN-38 siguiendo una pauta de 12 mg/kg cada 2 semanas durante 3 ciclos, que se reduce a 8 mg/kg cada dos semanas durante otros 4 ciclos. Se observa una mejora prolongada de las citopenias, reflejada en más del 50 % o un nivel de hemoglobina superior a 11 g por decilitro, un recuento absoluto de neutrófilos superior a 1 500 células por cmm o una cifra de trombocitos superior a 11k/cmm, que duró aproximadamente 9 meses.

**Ejemplo 34. Terapia de vanguardia de LDCBG con veltuzumab-CL2A-SN-38 combinado con bendamustina.**

Un hombre de 59 años presenta múltiples sitios de LDCBG, incluyendo en tórax, abdomen, ganglios linfáticos inguinales y bazo agrandado, confirmado mediante TC, FDG-TEP y diagnósticos inmunohistológicos/patológicos. Se administra bendamustina a una dosis de 90 mg/m<sup>2</sup> los días 1 y 2, combinada con veltuzumab-CL2A-SN-38 a una dosis de 6 mg/kg los días 7 y 14, administrado cada 4 semanas durante cuatro ciclos. La evaluación radiológica a partir de entonces muestra una respuesta parcial. Después de un descanso de 2 meses, la terapia se repite durante otros 2 ciclos y la evaluación radiológica muestra una respuesta completa. Las citopenias principalmente neutropenia, son tratables y no alcanzan un nivel de grado 3.

**Ejemplo 35. Terapia de vanguardia de linfoma de células del manto (LCM) con veltuzumab-CL2A-SN-38 combinado con lenalidomida.**

El paciente es un hombre de 68 años diagnosticado de LCM después acudir con un síntoma GI y letargo. La colonoscopia revela una masa cecal de 7 cm y su evaluación diagnóstica indica que tiene enfermedad en estadio IV. El paciente recibe una terapia combinada de lenalidomida, 25 mg por vía oral al día los días 1 a 21 cada 28 días. Después de dos ciclos, recibe veltuzumab-CL2A-SN-38 cada dos semanas a una dosis de 10 mg/kg durante 3 tratamientos, con un descanso de 2 semanas. Después, esta terapia se repite de nuevo. Dos semanas después de finalizar esta terapia, el paciente muestra una respuesta parcial de su lesión indicadora medida y se observa una reducción de otros ganglios linfáticos. Cuatro meses después, la terapia con lenalidomida se repite durante 21 días, seguida de 2 ciclos de veltuzumab-SN-38. Se demuestra entonces que su enfermedad se reduce aún más, aunque todavía no hay una respuesta completa.

**Ejemplo 36. Terapia con epratuzumab-SN-38 de un paciente con linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) recidivante/resistente**

Un hombre de 65 años con síntomas de pérdida de peso se somete a biopsia de una masa epigástrica, que se diagnostica como un linfoma difuso de células B grandes. Se le trata con 6 ciclos de R-CHOP estándar (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). Tiene neutropenia prolongada y persistente (700 ANC) con trombocitopenia leve (50-70k/ml), pero sin anemia real. Su IPI (índice pronóstico internacional) es alto. La masa epigástrica no muestra ningún cambio después de esta terapia, y se le pone en un régimen de tratamiento suave de epratuzumab-CL2A-SN-38 anti-CD22. Este es un régimen de 4 mg/kg infundidos cada dos semanas durante 4 infusiones, después una vez cada tres semanas durante otras 3 infusiones. Su linfoma epigástrico se mide por TC una semana después y muestra una marcada reducción del 52 %. El paciente continúa este tratamiento cada tres semanas durante otros 3 meses, y sigue mostrando esta reducción de su masa de linfoma, estabilizando su peso y recuperando su energía y actividades.

**Ejemplo 37. Terapia de un paciente con linfoma folicular recidivante con RFB4 humanizado**

Una mujer de 42 años presenta un dolor agudo, constante e intenso en su abdomen inferior abdomen que se irradia a su espalda. Las pruebas analíticas son normales, pero una ecografía abdominal muestra una masa sólida heterogénea en la parte inferior izquierda anterior que mide 7,5 × 6,2 × 7,0 cm. Las exploraciones por TC revelan una gran masa dentro del mesenterio izquierdo del intestino delgado, con afectación de los ganglios linfáticos adyacentes. Una biopsia de la masa, realizada con una aguja guiada mediante TC, muestra que se trata de un linfoma folicular, de grado 3. La inmunohistoquímica muestra un tipo de células B con resultados positivos para CD19, CD20, CD22, Bcl-2 y Bcl-6. Los estudios mediante TEP no revelan ninguna enfermedad por encima del diafragma, en la médula ósea o en el bazo, pero la biopsia de médula ósea confirma afectación del linfoma. La paciente se somete a 6 ciclos de quimioterapia R-CHOP, dando como resultado una respuesta completa a esta terapia 4 meses después. Sin embargo, a los 10 meses, la paciente sufre una recaída, con recidiva de su masa abdominal y ganglios linfáticos adyacentes, así como agrandamiento del bazo y mayor afectación de la médula ósea determinado mediante estudios de TEP y biopsia. La paciente comienza ahora un ciclo de terapia con el anticuerpo monoclonal anti-CD22 humanizado, RFB4, conjugado con 6 moléculas de SN-38 por IgG utilizando el enlazador CL2A, a una dosis de 8 mg/kg semanalmente durante 3 semanas, y después continuó con 8 mg/kg cada dos semanas durante otros 4 tratamientos. Dos semanas después, se somete a estudios de TC y FDG-TEP, y sus lesiones abdominales y bazo muestran una reducción del 40 % y una disminución general de la afectación de la médula ósea. Después de un descanso de 4 semanas, se implementa una terapia de 4 mg/kg semanalmente durante 4 semanas, seguida de 6 mg/kg cada dos semanas durante otros 5 tratamientos, con una nueva reducción medible de la suma de los tamaños de todas las lesiones medidas en un total del 60 %. La paciente continúa con una terapia de mantenimiento de hRFB4-CL2A-SN-38 de 8 mg/kg una vez al mes durante los 5 meses siguientes y mantiene su respuesta terapéutica.

**Ejemplo 38. Terapia con epratuzumab-CL2A-SN-38 de un paciente con leucemia linfoblástica aguda recidivante/resistente.**

Un hombre de 29 años con leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B precursoras CD22+ no ha respondido a la terapia con PEG-asparaginasa, ciclofosfamida, daunorrubicina, citarabina (ara-C), vincristina, leucovorina, prednisona, metotrexato y 6-mercaptopurina, y a la terapia paliativa con G-CSF (Neupogen), administradas como terapias de inducción/mantenimiento según un protocolo de Larson modificado. La leucemia del paciente es negativa para el cromosoma Filadelfia. Según los recuentos de blastos leucémicos en la sangre y médula ósea, el paciente muestra solo una respuesta mínima, con progresión de la enfermedad 4 meses después. El paciente recibe una dosis semanal de epratuzumab-CL2A-SN-38 siguiendo una pauta inicial de 6 mg/kg durante 4 semanas, y después se reduce a 6 mg/kg cada dos semanas durante 6 infusiones adicionales. El paciente se evalúa después mediante blastos leucémicos en la sangre y médula ósea, así como mediante estudios con FDG del tamaño del bazo y la afectación de la médula ósea, y parece que se obtiene una respuesta parcial, con una mejora concomitante de los signos y síntomas generales del paciente. Esta terapia continúa después durante los 8 meses siguientes, pero a 5 mg/kg cada dos semanas, con 3 semanas de terapia y 2 semanas de descanso, y se obtiene una remisión completa. El paciente está siendo evaluado como candidato para un trasplante de células madre hematopoyéticas.

**Ejemplo 39. Terapia con RFB4 humanizado-CL2A-SN-38 de un paciente con leucemia linfoblástica aguda recidivante/resistente**

Después de no responder a HIDAC (siglas del inglés *high-dose ara-C therapy*, terapia con dosis altas de citarabina (ara-C)), este hombre de 20 años con leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras, recibe terapia con anti-CD22 humanizado con IgG hRFB4 conjugado con SN-38 (promedio de 6 moléculas de fármaco por IgG), a una pauta de dosificación de 10 mg/kg semanalmente durante dos semanas, con 1 semana de descanso, seguido de infusiones de 10 mg/kg cada dos semanas durante 5 tratamientos adicionales. A continuación, se evalúa al paciente para determinar la presencia de blastocitos leucémicos en sangre y médula ósea, y muestra una reducción de > 90 %. Después de un descanso de 4 semanas, este ciclo de terapia se repite y la evaluación 4 semanas después muestra una respuesta completa sin enfermedad residual mínima, medida por PCR.

**Ejemplo 40. Terapia de consolidación con epratuzumab-CL2A-SN-38 en un paciente con LDCBG que recibe quimioterapia R-CHOP**

La paciente es una mujer de 56 años con adenopatía cervical bilateral y ganglios linfáticos cervicales que miden de 1,5 a 2,0 cm, así como un ganglio linfático axilar derecho de 3 cm, ganglios linfáticos retroperitoneales y pélvicos bilaterales que miden de 2,5 a 3,0 cm, a la que se la diagnostica un linfoma difuso de células B grandes en estadio 3 que es positivo para CD20 y CD22. Se la administra un régimen de quimioterapia R-CHOP estándar suministrado cada 21 días con filgrastim y antibióticos profilácticos. Después de recibir 6 ciclos de esta terapia, al paciente se le da un período de descanso de 2 meses y después recibe una terapia de consolidación con 8 mg/kg de epratuzumab-CL2A-SN-38, infundido cada dos semanas durante 3 tratamientos. Mientras que la respuesta después de la quimioterapia R-CHOP es mínima (menos del 30 % de cambio en las lesiones medidas), la terapia de consolidación con epratuzumab-CL2A-SN-38 da como resultado una respuesta parcial (> 50 % de disminución en la suma de todas las lesiones indicadoras). Después de un descanso de 3 meses, se repite este ciclo de terapia con epratuzumab-CL2A-SN-38, recibiendo nuevamente la paciente filgrastim y antibióticos profilácticos, y manteniendo su buena remisión.

**Ejemplo 41. Tratamiento de cáncer testicular metastásico recidivante con IMMU-31-CL2A-SN-38**

El paciente es un hombre de 30 años con antecedentes de cáncer testicular resecado de su testículo derecho, con metástasis sincrónicas en ambos pulmones que responde bien a la quimioterapia combinada. En el momento del diagnóstico, su título de alfa fetoproteína (AFP) en sangre estaba elevado a 1 110 ng/ml, pero disminuye a 109 ng/ml después de una terapia satisfactoria. Ahora presenta un título de AFP que aumenta gradualmente durante un período de 3 años, por lo que se realiza una exploración mediante TC y FDG-TEP de su cuerpo, revelando la recidiva de metástasis pulmonares en ambos pulmones. El paciente recibe terapia con el anticuerpo anti-AFP, IgG IMMU-31, conjugado con SN-38 a 6 moléculas de fármaco por IgG. Recibe dosis semanales de 12 mg/kg de este conjugado de anticuerpo-fármaco durante 3 semanas de un ciclo de 4 semanas, que se repite durante otro ciclo pero con una reducción de la terapia a 10 mg/kg. Después, esto se repite durante otros 2 ciclos. Dos semanas después, el examen radiológico de sus pulmones revela que la metástasis ha desaparecido. Su título de AFP en sangre es ahora de 18 ng/ml. El paciente vuelve a la actividad normal habiéndose obtenido una respuesta completa.

**Ejemplo 42. Tratamiento de carcinoma hepatocelular metastásico recidivante con IMMU-31-CL2A-SN-38**

Un hombre de 58 años con antecedentes de infección por hepatitis B, consumo excesivo de alcohol y tabaquismo, llega primero a la cirrosis hepática y después a un diagnóstico de carcinoma hepatocelular. En el momento en que acude después de que le haya resecado una parte del hígado, también tiene ganglios linfáticos regionales afectados. El paciente recibe un ciclo de terapia con sorafenib, refiere alguna mejoría general, pero no tiene ninguna reducción de su ganglio linfático regional o 2 metástasis pulmonares (pulmón derecho). La TC del hígado también sugiere que puede haber una recidiva en el parénquima hepático restante. Este paciente recibe ahora 3 ciclos de terapia con IMMU-31-CL2A-SN-38, comprendiendo cada uno una pauta de 16 mg/kg semanales durante 2 semanas de un ciclo de 4 semanas. Después de los 3 ciclos que comprenden 6 dosis, el paciente es reevaluado y muestra una disminución en su título de AFP circulante desde el valor basal de 2 000 ng/ml a 170 ng/ml, así como una reducción del 20 % de la suma de sus lesiones indicadoras medidas. Después de un descanso de 2 meses, se instituye otro ciclo de terapia de 3 ciclos, pero con una reducción de la dosis a 1 mg/kg por infusión. Un mes después, hay una mayor reducción de todas las lesiones medidas, al 35 % del valor basal, así como una ligera disminución en el título de AFP en sangre a 100 ng/ml. El paciente está recibiendo una terapia de mantenimiento de una dosis al mes mientras no haya progresión de la enfermedad o toxicidades limitantes.

**Ejemplo 43. Conservación de los inmunos conjugados**

Los conjugados descritos en el Ejemplo 2 se purificaron y el tampón se cambió por ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), pH 6,5, y además se formularon con trehalosa (concentración final 25 mM) y polisorbato 80 (concentración final 0,01 % v/v), llegando la concentración final del tampón a 22,25 mM como resultado de la adición de excipiente. Los conjugados formulados se liofilizaron y se conservaron en viales sellados, a una temperatura de conservación entre 2° C y 8° C. Los inmunos conjugados liofilizados eran estables en las condiciones de conservación y mantuvieron sus actividades fisiológicas.

**Listado de secuencias**

<110> IMMUNOMEDICS, INC.

5 <120> INMUNOCONJUGADOS DE ANTICUERPO-SN-38 CON UN ENLAZADOR CL2A

<130> I 10156 EP

<140> EP 14 828 674.3

10 <141> 17/04/2014

<150> 13/948,732

<151> 23/07/2013

15 <160> 162

<170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

20 <211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 1

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

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

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

30 <210> 2

<211> 45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 2

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

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

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

40 <210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 819 573 T3

<400> 3

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

Ala

5 <210> 4  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 4

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

Gln Gln Ala Gly Cys  
20

15 <210> 5  
<211> 50  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 5

Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys His Asn Ile Gln Ala  
1 5 10 15

Leu Leu Lys Asp Ser Ile Val Gln Leu Cys Thr Ala Arg Pro Glu Arg  
20 25 30

Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Arg Leu Glu Lys Glu Glu  
35 40 45

Ala Lys  
50

25 <210> 6  
<211> 55  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

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

35 <400> 6

ES 2 819 573 T3

Met Ser Cys Gly Gly Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys  
 1 5 10 15

His Asn Ile Gln Ala Leu Leu Lys Asp Ser Ile Val Gln Leu Cys Thr  
 20 25 30

Ala Arg Pro Glu Arg Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Arg  
 35 40 45

Leu Glu Lys Glu Glu Ala Lys  
 50 55

<210> 7

<211> 23

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 7

Cys Gly Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser  
 1 5 10 15

Asp Val Phe Gln Gln Gly Cys  
 20

<210> 8

15 <211> 51

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys His Asn Ile Gln Ala  
 1 5 10 15

Leu Leu Lys Asp Val Ser Ile Val Gln Leu Cys Thr Ala Arg Pro Glu  
 20 25 30

Arg Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Lys Leu Glu Lys Glu  
 35 40 45

Glu Ala Lys  
 50

20

<210> 9

<211> 54

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 819 573 T3

Ser Leu Lys Gly Cys Glu Leu Tyr Val Gln Leu His Gly Ile Gln Gln  
 1 5 10 15

Val Leu Lys Asp Cys Ile Val His Leu Cys Ile Ser Lys Pro Glu Arg  
 20 25 30

Pro Met Lys Phe Leu Arg Glu His Phe Glu Lys Leu Glu Lys Glu Glu  
 35 40 45

Asn Arg Gln Ile Leu Ala  
 50

<210> 10

<211> 44

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

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

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

10

<210> 11

<211> 44

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 11

Ser Ile Glu Ile Pro Ala Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Phe Thr  
 1 5 10 15

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

Gln His Phe Thr Arg Leu Gln Gln Glu Asn Glu Arg  
 35 40

20 <210> 12

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 12

ES 2 819 573 T3

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

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

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

5 <210> 13  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 13  
 Ser Lys Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

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

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

15 <210> 14  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 14  
 Ser Arg Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

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

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

25 <210> 15  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 15

ES 2 819 573 T3

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

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

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

5 <210> 16  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 16

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

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

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

15 <210> 17  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 17

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

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

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

25 <210> 18  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 18

ES 2 819 573 T3

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

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

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

5 <210> 19  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 19  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Asn Gly Tyr  
 1 5 10 15

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

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

15 <210> 20  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 20  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Ala Tyr  
 1 5 10 15

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

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

25 <210> 21  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 21

ES 2 819 573 T3

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

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

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

<210> 22

<211> 44

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 22

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

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

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

<210> 23

<211> 44

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 23

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

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

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

<210> 24

<211> 44

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 24

ES 2 819 573 T3

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

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

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

5 <210> 25  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 25

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

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

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

15 <210> 26  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 26

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

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

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

25 <210> 27  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 27

ES 2 819 573 T3

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

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

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

5 <210> 28  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 28

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

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

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

15 <210> 29  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 29

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

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

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

25 <210> 30  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 30

ES 2 819 573 T3

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

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

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

5 <210> 31  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 31

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

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

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

15 <210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 32

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

Ala

25 <210> 33  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 33

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

Ala

35 <210> 34  
 <211> 17

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 34

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

Ala

10 <210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 35

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

Ala

20

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 36

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

Ala

30

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

40 <400> 37

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

Ala

<210> 38

<211> 17

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 819 573 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 38

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

5

Ala

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 39

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

Ala

<210> 40

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 40

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

Ala

<210> 41

30 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 41

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

Ala

40 <210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 819 573 T3

<400> 42

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

Ala

5 <210> 43  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 43

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

Ala

15 <210> 44  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 44

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

Ala

25 <210> 45  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 45

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

Ala

40 <210> 46  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 46



ES 2 819 573 T3

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

**Ala**

5 <210> 51  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 51  
 Gln Ile Glu Tyr Lys Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln  
 1 5 10 15

**Ala**

15 <210> 52  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 52  
 Gln Ile Glu Tyr His Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln  
 1 5 10 15

**Ala**

25 <210> 53  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 53  
 Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln  
 1 5 10 15

**Ala**

35 <210> 54  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 54

ES 2 819 573 T3

Pro Leu Glu Tyr Gln Ala Gly Leu Leu Val Gln Asn Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15

Ala Ile

5 <210> 55  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 55  
Leu Leu Ile Glu Thr Ala Ser Ser Leu Val Lys Asn Ala Ile Gln Leu  
1 5 10 15

Ser Ile

15 <210> 56  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 56  
Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu Gln  
1 5 10 15

Val Lys

25 <210> 57  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 57  
Ala Leu Tyr Gln Phe Ala Asp Arg Phe Ser Glu Leu Val Ile Ser Glu  
1 5 10 15

Ala Leu

35 <210> 58  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 58

ES 2 819 573 T3

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

**Thr**

5 <210> 59  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 59

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

**Phe**

15 <210> 60  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 60

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

**Ala Val**

25 <210> 61  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 61

Thr Ala Glu Glu Val Ser Ala Arg Ile Val Gln Val Val Thr Ala Glu  
 1 5 10 15

**Ala Val**

35 <210> 62  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 62

ES 2 819 573 T3

Gln Ile Lys Gln Ala Ala Phe Gln Leu Ile Ser Gln Val Ile Leu Glu  
 1 5 10 15

Ala Thr

<210> 63  
 <211> 16  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 63  
 Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Val Ser Asp Val Met Gln Gln  
 1 5 10 15

<210> 64  
 <211> 24  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 64  
 Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu  
 1 5 10 15

Gln Val Lys Ala Ala Gly Ala Tyr  
 20

<210> 65  
 <211> 18  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 65  
 Leu Glu Gln Tyr Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala  
 1 5 10 15

Thr Glu

<210> 66  
 <211> 20  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 66

ES 2 819 573 T3

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

Phe Gln Gln Cys  
 20

5 <210> 67  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 67  
 Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Pro Asp Asn Ala Ile Gln Gln  
 1 5 10 15

Ala

15 <210> 68  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 68  
 Lys Gly Ala Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala  
 1 5 10 15

Val Ile Glu Gln Val Lys Ala Ala Gly  
 20 25

25 <210> 69  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 69  
 Lys Gly Ala Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Pro Asp Ala  
 1 5 10 15

Pro Ile Glu Gln Val Lys Ala Ala Gly  
 20 25

35 <210> 70  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 70



<400> 74

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

Ala Pro Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr  
20 25

5 <210> 75

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 75

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

Ala Val Glu Lys Ala Val Gln Gln Tyr  
20 25

15

<210> 76

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 76

Glu Glu Gly Leu Asp Arg Asn Glu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Phe Gln  
1 5 10 15

Ile Ile Ser Gln Val Ile Ser Glu Ala  
20 25

25

<210> 77

<211> 25

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 77

Leu Val Asp Asp Pro Leu Glu Tyr Gln Ala Gly Leu Leu Val Gln Asn  
1 5 10 15

Ala Ile Gln Gln Ala Ile Ala Glu Gln  
20 25

40

<210> 78

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 819 573 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <400> 78

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

Ala Ile Gln Leu Ser Ile Glu Gln Leu  
20 25

<210> 79

<211> 25

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15

<400> 79

Leu Glu Lys Gln Tyr Gln Glu Gln Leu Glu Glu Glu Val Ala Lys Val  
1 5 10 15

Ile Val Ser Met Ser Ile Ala Phe Ala  
20 25

<210> 80

20 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 80

Asn Thr Asp Glu Ala Gln Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met  
1 5 10 15

Ile Val Ser Asp Ile Met Gln Gln Ala  
20 25

30 <210> 81

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 81

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

Ala Ile Glu Lys Ala Glu Arg Glu Leu  
20 25

40

<210> 82

<211> 25

<212> PRT

ES 2 819 573 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5

<400> 82

Asn Gly Ile Leu Glu Leu Glu Thr Lys Ser Ser Lys Leu Val Gln Asn  
 1 5 10 15  
 Ile Ile Gln Thr Ala Val Asp Gln Phe  
 20 25

<210> 83

10

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 83

Thr Gln Asp Lys Asn Tyr Glu Asp Glu Leu Thr Gln Val Ala Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Val Glu Asp Val Ile Asn Tyr Ala  
 20 25

<210> 84

20

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 84

Glu Thr Ser Ala Lys Asp Asn Ile Asn Ile Glu Glu Ala Ala Arg Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Val Glu Lys Ile Leu Val Asn His  
 20 25

<210> 85

30

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 85

ES 2 819 573 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

ES 2 819 573 T3

210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325	330	

<210> 86  
 <211> 330  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

10 <400> 86

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

ES 2 819 573 T3

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

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

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

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

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

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 87

<211> 44

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

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

5

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Ser o Thr

10

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> His, Lys o Arg

15

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Gln o Asn

20

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Gly o Ala

25

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> Thr o Ser

30

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)..(11)  
<223> Glu o Asp

35

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (14)..(14)  
<223> Gln o Asn

40

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (15)..(15)  
<223> Gly o Ala

45

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17)..(17)  
<223> Thr o Ser

50

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (19)..(19)  
<223> Glu o Asp

55

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (22)..(22)  
<223> Arg o Lys

60

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (23)..(24)  
<223> Gln o Asn

65

<220>

ES 2 819 573 T3

<221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Asp o Glu

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (30)..(30)  
 <223> Glu o Asp

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (32)..(32)  
 <223> Ala, Leu, Ile o Val

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Glu o Asp

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (37)..(37)  
 <223> Thr o Ser

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (38)..(38)  
 <223> Arg o Lys

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Arg o Lys

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Glu o Asp

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (42)..(42)  
 <223> Ala, Leu, Ile o Val

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (43)..(43)  
 <223> Arg o Lys

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (44)..(44)  
 <223> Ala, Leu, Ile o Val

55 <400> 87  
 Xaa Xaa Ile Xaa Ile Pro Pro Xaa Leu Xaa Xaa Leu Leu Xaa Xaa Tyr  
 1 5 10 15  
 Xaa Val Xaa Val Leu Xaa Xaa Xaa Pro Pro Xaa Leu Val Xaa Phe Xaa  
 20 25 30  
 Val Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 35 40

<210> 88  
<211> 17  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
  
10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Gln o Asn  
  
15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Ile, Leu o Val  
  
20 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> Glu o Asp  
  
25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Tyr, Phe, Thr o Ser  
  
30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> Leu, Ile o Val  
  
35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)..(7)  
<223> Lys o Arg  
  
40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Gln o Asn  
  
45 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)..(11)  
<223> Asp o Glu  
  
50 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12)..(12)  
<223> Asn o Gln  
  
55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (15)..(16)  
<223> Gln o Asn  
  
60 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17)..(17)  
<223> Ala, Leu, Ile o Val  
  
65 <400> 88

# ES 2 819 573 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Ile Val Xaa Xaa Ala Ile Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa

<210> 89  
<211> 44  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Ser o Thr

15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Gln o Asn

20 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> Thr o Ser

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (18)..(18)  
<223> Val, Ile, Leu o Ala

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (23)..(23)  
<223> Gln o Asn

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (33)..(33)  
<223> Val, Ile, Leu o Ala

40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (34)..(34)  
<223> Glu o Asp

45 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (37)..(37)  
<223> Thr o Ser

50 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (38)..(38)  
<223> Arg o Lys

55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (40)..(40)  
<223> Arg o Lys

60 <220>

ES 2 819 573 T3

<221> MOD\_RES  
 <222> (42)..(42)  
 <223> Ala, Leu, Ile o Val

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (44)..(44)  
 <223> Ala, Leu, Ile o Val

10 <400> 89  
 Xaa His Ile Xaa Ile Pro Pro Gly Leu Xaa Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15  
 Thr Xaa Glu Val Leu Arg Xaa Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30  
 Xaa Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Leu Xaa Glu Xaa Arg Xaa  
 35 40

15 <210> 90  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 90

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala  
 1 5 10

25 <210> 91  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 91

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
 1 5

35 <210> 92  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 92

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr  
 1 5

45 <210> 93  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>

ES 2 819 573 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 93

**Asn Tyr Gly Met Asn**  
1 5

5

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 94

**Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys**  
1 5 10 15

15

**Gly**

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 95

**Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val**  
1 5 10

30

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 96

**Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala**  
1 5 10

40

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 97

**Trp Thr Ser Thr Arg His Thr**  
1 5

50

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

ES 2 819 573 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 98

Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser  
1 5

5

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 99

Thr Tyr Trp Met Ser  
1 5

15

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 100

Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys  
1 5 10 15

**Asp**

<210> 101

<211> 10

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35

<400> 101

Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

40

<210> 102

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 102

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

50

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 819 573 T3

<400> 103

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

5 <210> 104  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 104

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr  
1 5

15 <210> 105  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 105

Asn Tyr Gly Met Asn  
1 5

25 <210> 106  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 106

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
1 5 10 15

35 Gly

<210> 107  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <400> 107

Lys Gly Trp Met Asp Phe Asn Ser Ser Leu Asp Tyr  
1 5 10

50 <210> 108  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 108

ES 2 819 573 T3

**Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Ile His**  
**1 5 10**

5 <210> 109  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 109

**Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser**  
**1 5**

15 <210> 110  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 110

**Gln Gln Trp Ser Tyr Asn Pro Pro Thr**  
**1 5**

25 <210> 111  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 111

**Asp Tyr Tyr Met Ser**  
**1 5**

35 <210> 112  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 112

**Phe Ile Ala Asn Lys Ala Asn Gly His Thr Thr Asp Tyr Ser Pro Ser**  
**1 5 10 15**

45 **Val Lys Gly**

50 <210> 113  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 113



ES 2 819 573 T3

Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 119  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 119

Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10

15 <210> 120  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 120

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ala Asn His Lys Tyr Leu Ala  
 1 5 10 15

25 <210> 121  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 121

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5

35 <210> 122  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 122

His Gln Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe  
 1 5

45 <210> 123  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

55 <400> 123

ES 2 819 573 T3

Ser Tyr Trp Leu His  
1 5

5 <210> 124  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 124  
Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe Lys  
1 5 10 15

**Asp**

15 <210> 125  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 125  
Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr  
1 5

25 <210> 126  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 126  
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

35 <210> 127  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <400> 127  
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

50 <210> 128  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 128

ES 2 819 573 T3

**Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Tyr Thr**  
**1 5**

5 <210> 129  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 129  
**Glu Tyr Val Ile Thr**  
**1 5**

15 <210> 130  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 130  
**Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe Lys**  
**1 5 10 15**

25 <210> 131  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 131  
**Glu Asp Leu**  
**1**

35 <210> 132  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 132  
**Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr**  
**1 5 10**

45 <210> 133  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 133  
**Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser**  
**1 5**

55 <210> 134  
 <211> 9  
 <212> PRT

ES 2 819 573 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5

<400> 134

**His Gln Trp Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr**

1

5

<210> 135

10

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 135

**Ser Tyr Val Leu His**

1

5

<210> 136

20

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 136

**Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys**  
1 5 10 15

**Gly**

30

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 137

**Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr**  
1 5 10

40

<210> 138

<211> 5

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

50

<400> 138

**Ser Tyr Val Ile His**

1

5

<210> 139

ES 2 819 573 T3

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 139  
 Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

10 <210> 140  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 140  
 Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr  
 1 5

20 <210> 141  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

30 <400> 141  
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Gly  
 1 5 10

35 <210> 142  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 142  
 Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro  
 1 5

45 <210> 143  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 143  
 Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr  
 1 5

55 <210> 144  
 <211> 5

ES 2 819 573 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 144

**Asn Tyr Gly Met Asn**  
1 5

10 <210> 145  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 145

**Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Arg Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys**  
1 5 10 15

**Gly**

20 <210> 146  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 146

**Asp Ile Thr Ala Val Val Pro Thr Gly Phe Asp Tyr**  
1 5 10

30 <210> 147  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

40 <400> 147

**Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala**  
1 5 10

45 <210> 148  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 148

**Ala Ala Ser Asn Leu Ala Asp**  
1 5

55 <210> 149  
<211> 9  
<212> PRT

ES 2 819 573 T3

<213> Secuencia artificial

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

5 <400> 149

Gln	His	Phe	Trp	Thr	Thr	Pro	Trp	Ala
1				5				

<210> 150  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 150

Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Ile	His
1				5					10

20 <210> 151  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 151

Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1				5		

30 <210> 152  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 152

Gln	Gln	Trp	Thr	Ser	Asn	Pro	Pro	Thr
1				5				

40 <210> 153  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

50 <400> 153

Ser	Tyr	Asn	Met	His
1				5

<210> 154  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 819 573 T3

<400> 154

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 155  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 155

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

15 <210> 156  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 156

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15

25 <210> 157  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 157

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser  
 1 5

40 <210> 158  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 158

Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr  
 1 5

50 <210> 159  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 819 573 T3

<400> 159

Ser Tyr Trp Met Asn  
1 5

5 <210> 160  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 160  
Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

15 <210> 161  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 161  
Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10 15

25 <210> 162  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

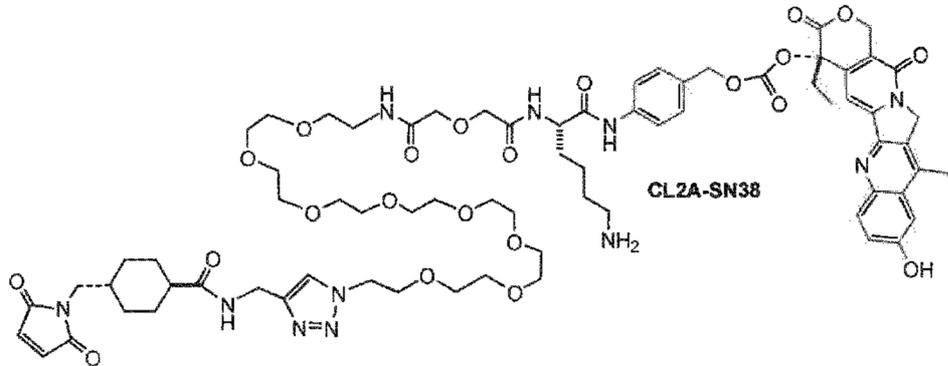
30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 162  
Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro  
1 5 10 15

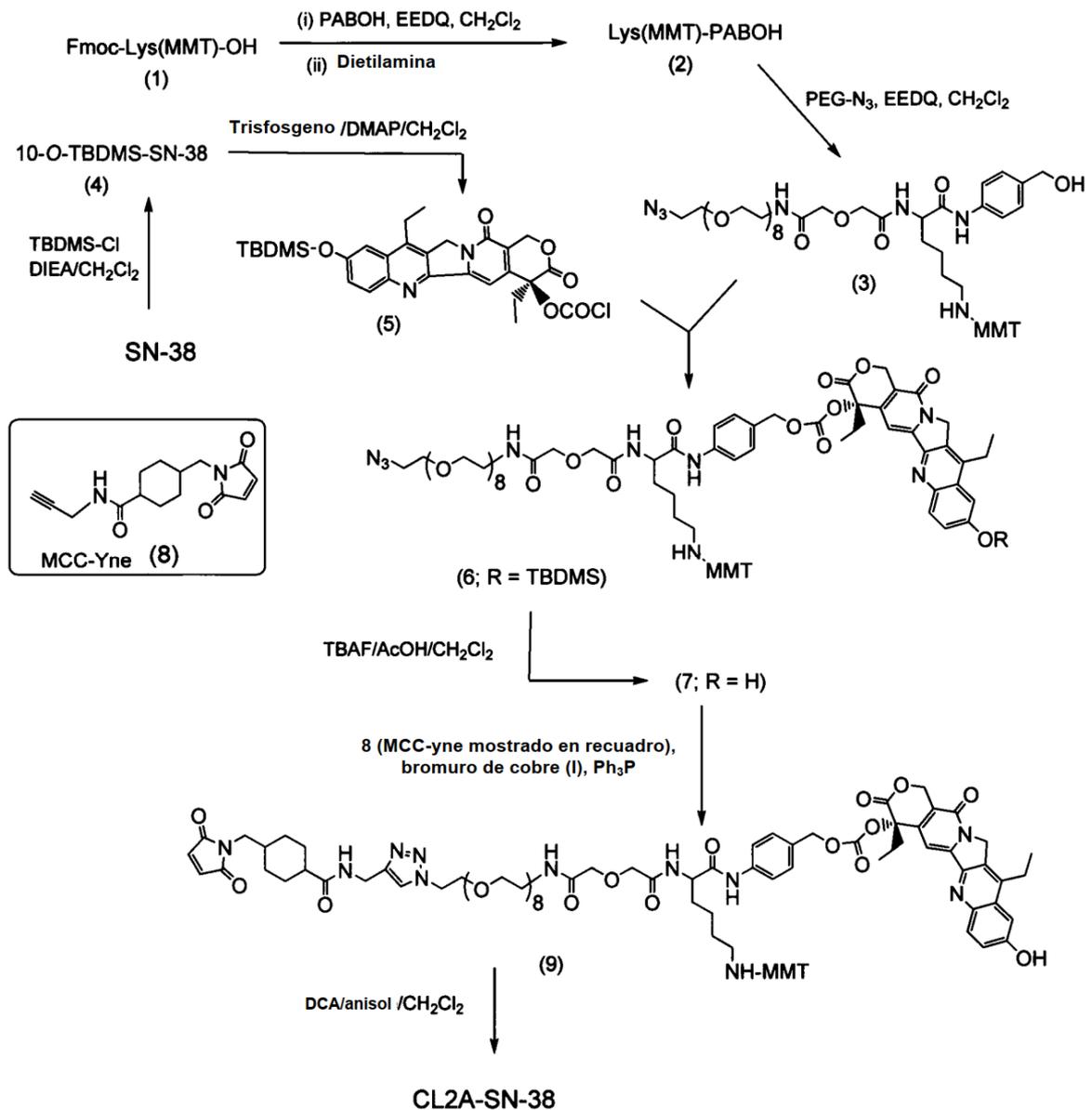
35

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un compuesto, CL2A-SN-38, que presenta la estructura,



que comprende realizar un esquema de reacción como el que se muestra:



5

que comprende además hacer reaccionar SN-38 con cloruro de terc-butildimetilsililo (TBDMS-Cl) para producir 10-O-TBDMS-SN-38 (producto intermedio 4), en donde la reacción se lleva a cabo en disolvente diclorometano.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además hacer reaccionar 10-O-TBDMS-SN-38 (producto intermedio 4) con trifosgeno y DMAP para producir 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-cloroformiato (producto intermedio reactivo 5), en donde la reacción se realiza añadiendo trifosgeno a una mezcla de reacción de diclorometano que contiene el producto intermedio 4, y el trifosgeno se añade en partes, para reducir la reacción exotérmica durante la fabricación a gran escala y mantener un rendimiento de reacción elevado.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además precipitar Lys(MMT)-PABOH (producto intermedio 2) con heptano.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además hacer reaccionar azido-PEG-Lys(MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38 (producto intermedio 7) con MCC-Yne (producto intermedio 8) mediante una reacción de cicloadición catalizada con cobre para producir MCC-PEG-Lys(MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38 (producto intermedio 9), en donde la reacción se lleva a cabo durante 14 h para mejorar el rendimiento del producto.
5. El método de la reivindicación 4, en donde el producto intermedio 9 se purifica primero mediante cromatografía en gel de sílice, seguido de extracción con EDTA para eliminar el cobre.
6. Un método para la fabricación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugado con SN38, en donde el método comprende hacer reaccionar una fracción de maleimida de CL2A-SN38, preparada mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, para fabricar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugado con SN38.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a entre 1 y 12 copias de CL2A-SN38.
8. El método de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en LL1 (anti-CD74), LL2 (anti-CD22), RFB4 (anti-CD22), RS7 (anti-EGP-1), PAM4 (anti-MUC5AC), KC4 (anti-mucina), A19 (anti-CD 19), A20 (anti-CD20), MN-14 (anti-CEACAM5), MN-15 (anti-CEACAM6), MN-3 (anti-CEACAM6), R1 (anti-IGF-1R), Mu-9 (anti-CSAp), Immu 31 (anti-AFP), CC49 (anti-TAG-72), J591 (anti-PSMA), HuJ591 (anti-PSMA), AB-PG1-XG 1-026 (dímero anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (anti-anhidrasa carbónica IX) y hL243 (anti-HLA-DR).
9. El método de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en anhidrasa carbónica IX, alfafetoproteína (AFP),  $\alpha$ -actinina-4, ART-4, B7, Ba 733, BAGE, antígeno BrE3, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8/m, CCL19, CCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD132, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1 $\alpha$ , antígeno p específico de colon (CSAp), CEACAM5, CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, receptor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, GAGE, gp100, GRO- $\beta$ , H2B, H3, H4, HLA-DR, HM1.24, gonadotropina coriónica humana (HCG), HER2/neu, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2, Ia, IGF-R, IFN- $\gamma$ , IFN-a, IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ , 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-23, IL-25, factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, factor inhibidor de la migración de macrófagos (FIM), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, FIM, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, PD-1, PD-L1, receptor de PD-1, factor de crecimiento placentario, p53, PLAGL2, fosfatasa ácida prostática, PSA, PRAME, PSMA, PIGF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, S100, survivina, survivina-2B, TAC, TAG-72, tenascina, receptores de TRAIL, TNF-a, antígeno Tn, antígeno de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, VEGFR, fibronectina ED-B, WT-1, antígeno 17-1A, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, bcl-2, bcl-6, Kras, y un producto oncogénico.

FIG. 1

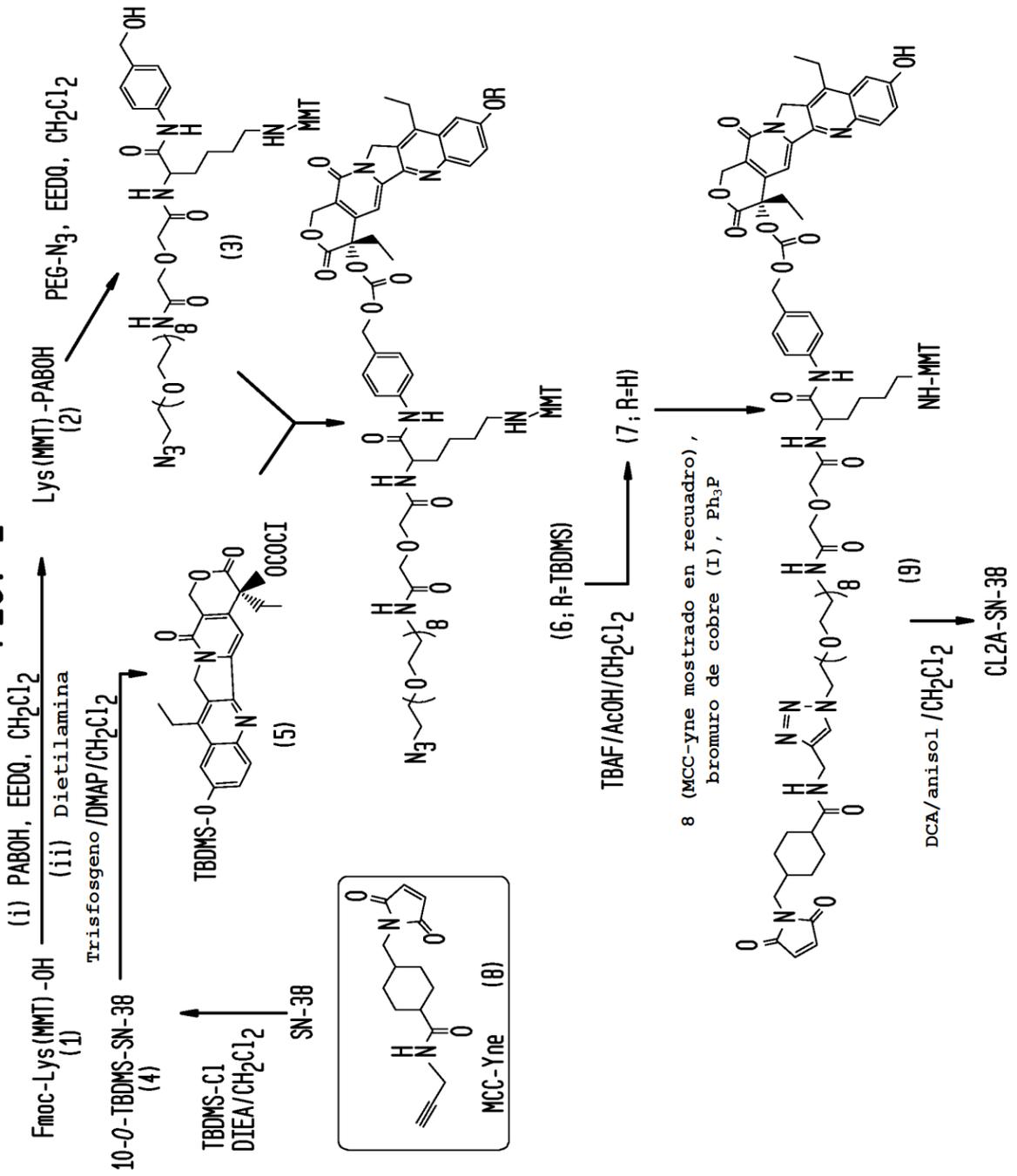
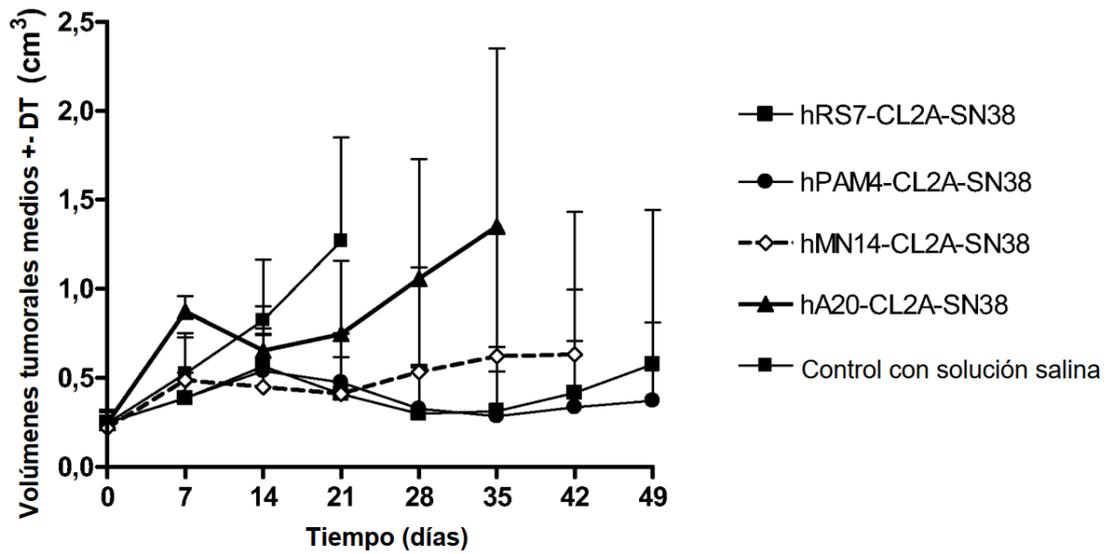


FIG. 2

Eficacia terapéutica de inmunocombinados Mab-CL2A-SN38 en ratones portadores de tumores Capan-1

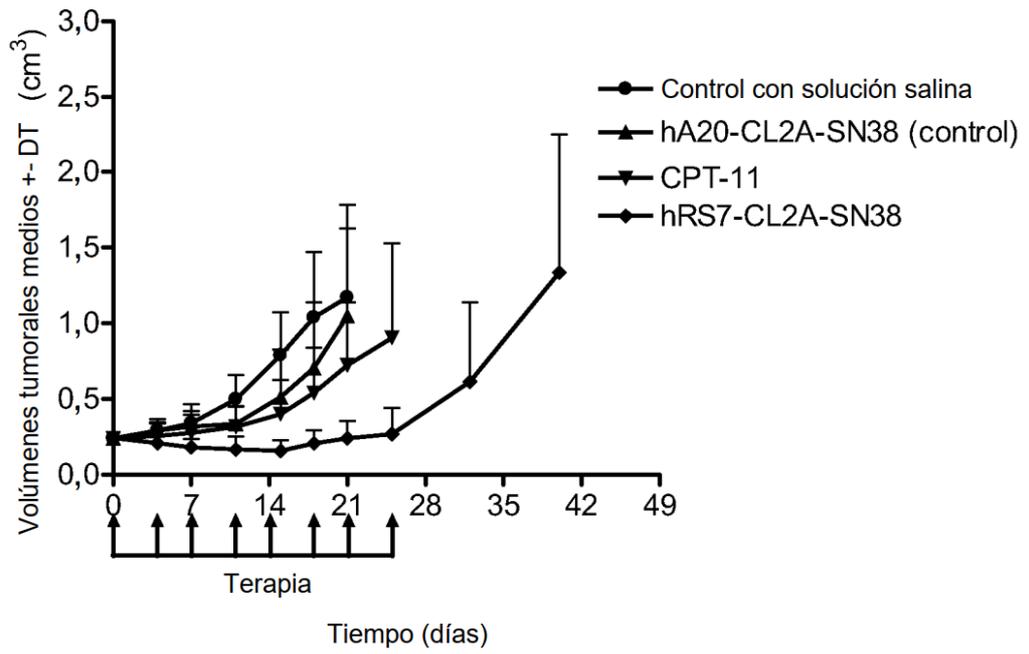
(250 µg dos veces a la semana durante 4 semanas), n = 9-10



**FIG. 3**

Eficacia terapéutica de inmunocombinados Mab-CL2A-SN38 en ratones portadores de xenoinjerto de adenocarcinoma pancreático (BxPC-3)

(500 µg dos veces a la semana durante 4 semanas) , n = 10



**FIG. 4**

Eficacia terapéutica de hMN-14.CL2A-SN38 en cáncer colorrectal humano experimental (LS 174T)

(500 mg i.p. dos veces a la semana durante 4 semanas), n = 10

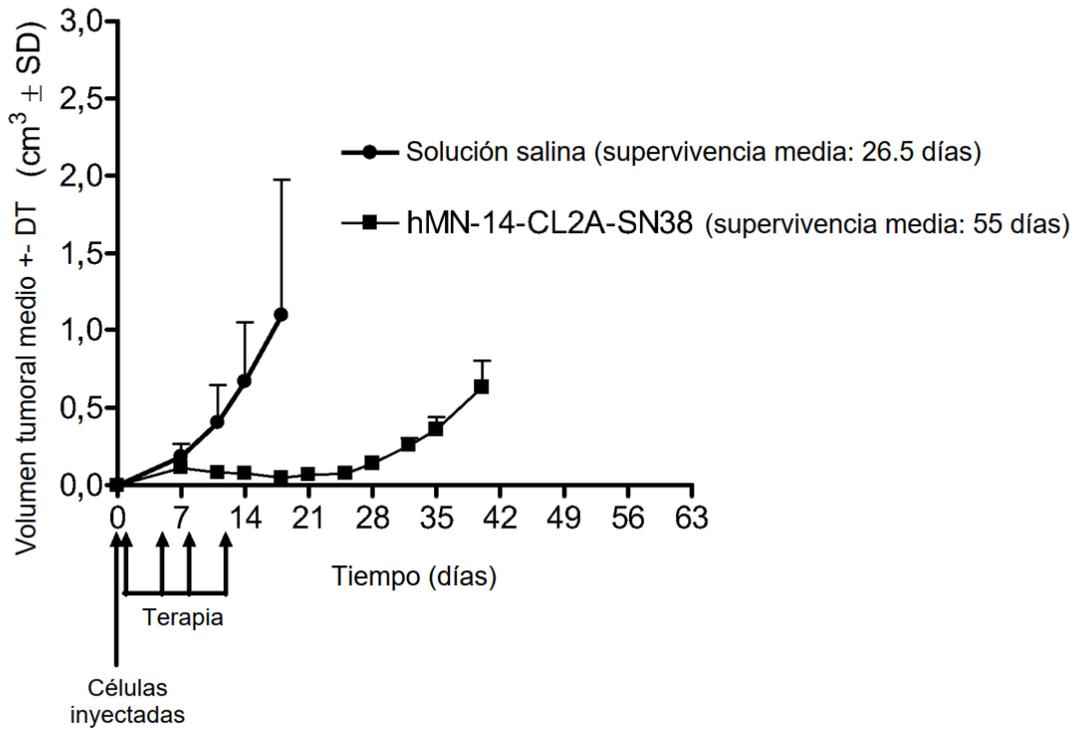


FIG. 5A

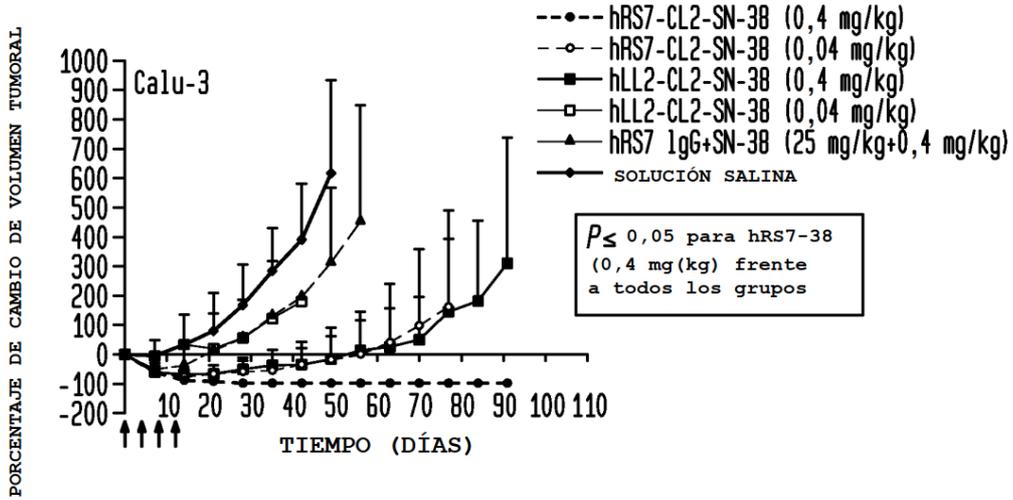


FIG. 5B

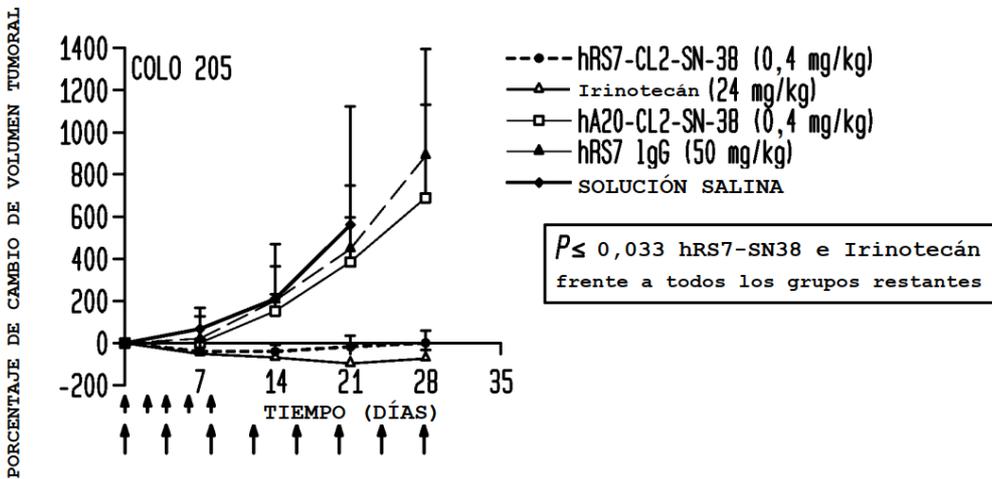


FIG. 5C

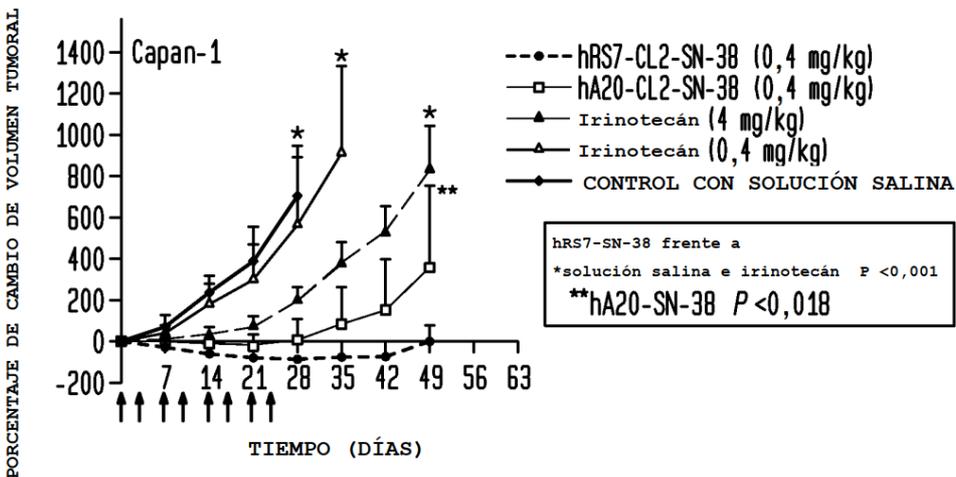


FIG. 5D

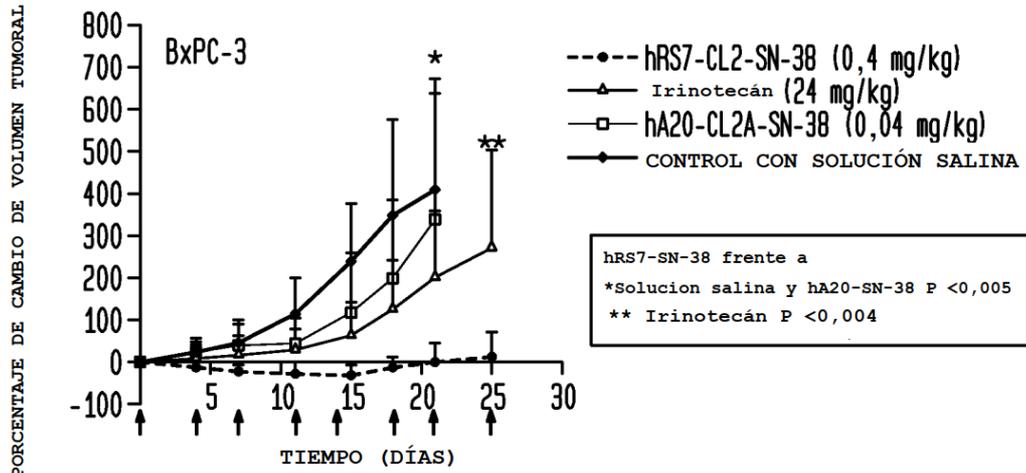


FIG. 5E

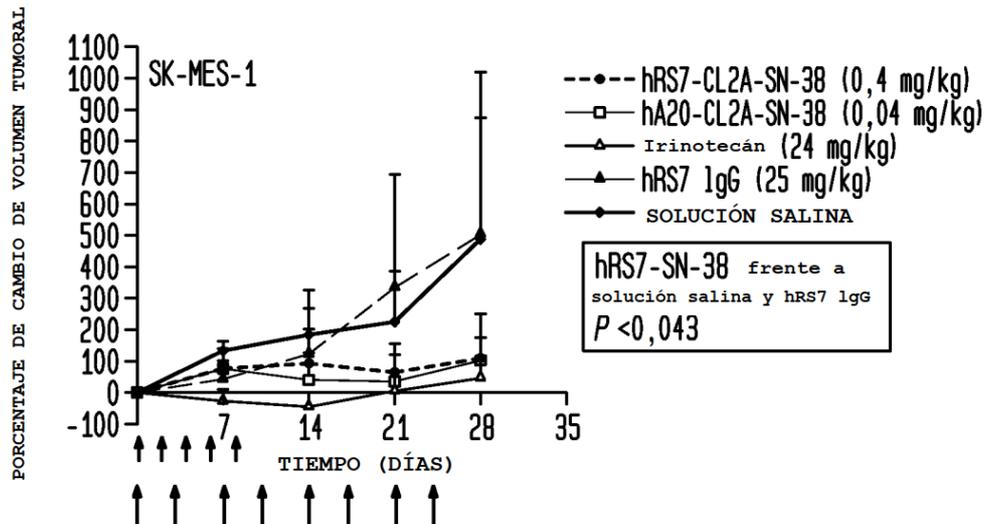


FIG. 6

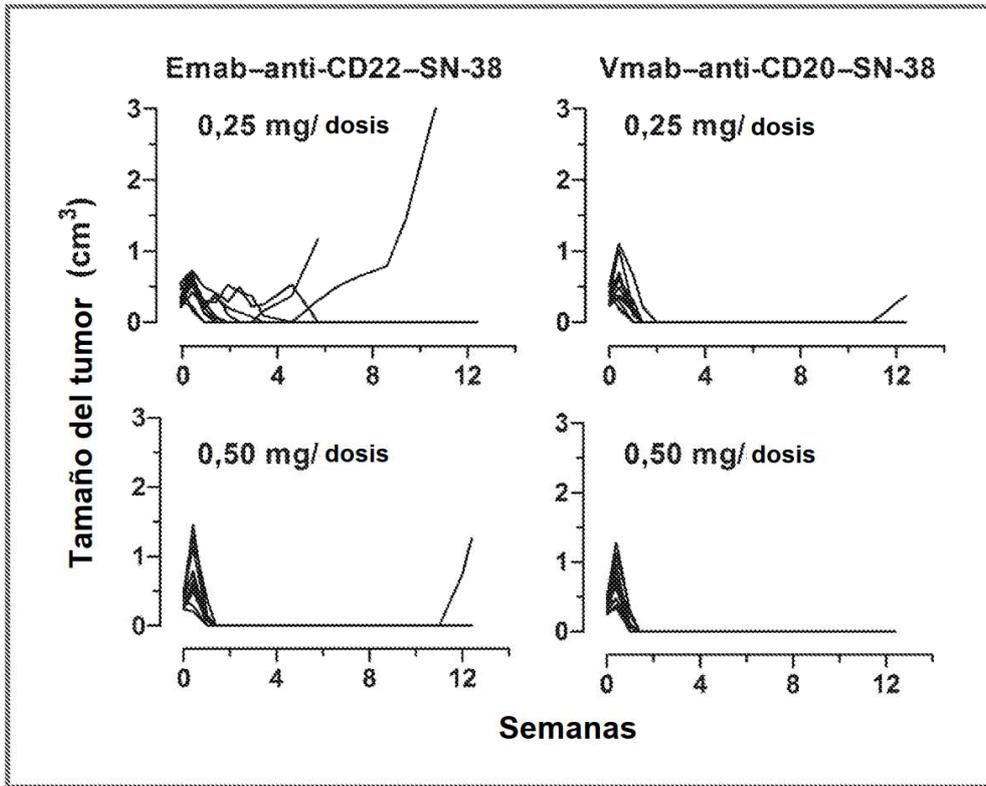
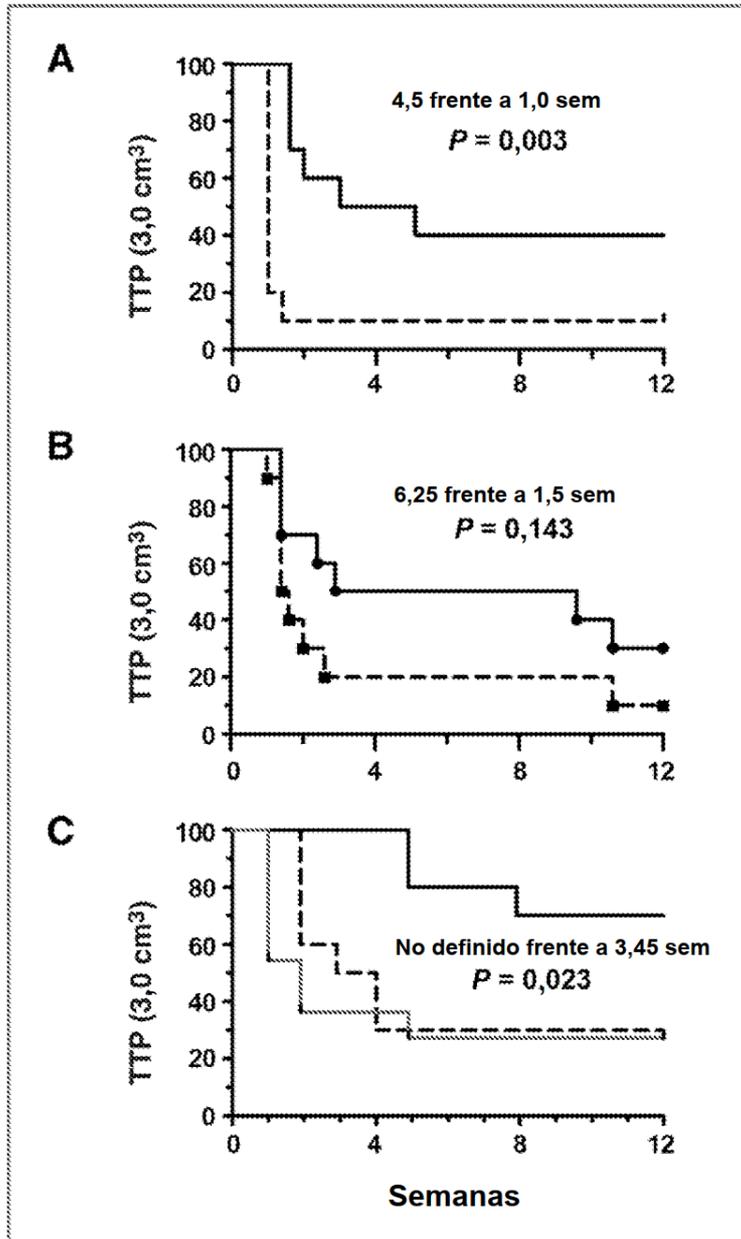


FIG. 7



# FIG. 8 Labetuzumab-SN-38: Paciente 009

Historial quirúrgico, quimioterapéutico/terapia con anticuerpos

