



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 241 129**

⑯ Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

⑯ Número de solicitud europea: **98912936 .6**

⑯ Fecha de presentación : **17.03.1998**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **0969866**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2000**

④ Título: **Inmunoterapia de malignidad de linfocitos B utilizando anticuerpos anti-CD22.**

⑩ Prioridad: **24.03.1997 US 41506 P**

⑬ Titular/es: **Immunomedics, Inc.**
300 American Road
Morris Plains, New Jersey 07950, US

⑤ Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.10.2005**

⑦ Inventor/es: **Goldenberg, David, M.**

⑤ Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **04.06.2009**

⑤ Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **04.06.2009**

⑭ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

DESCRIPCIÓN

Inmunoterapia de malignidad de linfocitos B utilizando anticuerpos anti-CD22.

5 **Antecedentes de la invención**

1. **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los medios inmunoterapéuticos para tratar la malignidad de linfocitos B. En particular, la presente invención se refiere al tratamiento de la malignidad de linfocitos B administrando comparativamente bajas dosis de anticuerpos que se unen al antígeno CD22. La presente invención se refiere asimismo a terapias multimodales en las que la terapia con anti-CD22 se complementa con quimioterapia, o con proteínas terapéuticas, tales como inmunoconjungados y proteínas de fusión del anticuerpo.

15 **2. Antecedentes**

Los linfomas de linfocitos B, tales como el subtipo de linfocito B del linfoma distinto del de Hodgkin, contribuyen significativamente a la mortalidad por cáncer. La respuesta de la malignidad de linfocitos B a varias formas de tratamiento es mixta. Por ejemplo, en los casos en los que es posible la estadificación clínica adecuada de un linfoma distinto del de Hodgkin, la terapia de radiación del campo puede proporcionar tratamiento satisfactorio. Todavía, aproximadamente la mitad de los pacientes mueren de esta enfermedad. Devesa *et al.*, *J. Nat'l Cancer Inst.* 79:701 (1987).

La mayoría de las leucemias linfocíticas crónicas son de la estirpe del linfocito B. Freedman, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 4:405 (1990). Este tipo de malignidad de linfocitos B es la leucemia más frecuente en el mundo occidental. Goodman *et al.*, *Leukemia and Lymphoma* 22:1 (1996). La historia natural de la leucemia linfocítica crónica comprende varias fases. En la fase inicial, la leucemia linfocítica crónica es una enfermedad poco activa, caracterizada por la acumulación de la malignidad de pequeños linfocitos B, maduros, funcionalmente incompetentes que presentan una vida prolongada. A la larga, disminuye la duplicación del tiempo de la malignidad de los linfocitos B y los pacientes se vuelven cada vez más sintomáticos. Mientras que el tratamiento puede proporcionar alivio sintomático, la supervivencia general de los pacientes está sólo afectada al mínimo. Las últimas etapas de la leucemia linfocítica crónica se caracterizan por la anemia y/o trombocitopenia significativas. En este momento, la supervivencia media es menor de dos años. Foon *et al.*, *Annals Int. Medicine* 113:525 (1990). Debido a la tasa muy baja de proliferación celular, la leucemia linfocítica crónica es resistente al tratamiento.

35 Los procedimientos de tratamiento tradicionales de la malignidad de linfocitos B incluyendo la quimioterapia y la radioterapia, presentan utilidad limitada debido a los efectos secundarios tóxicos. La utilización de anticuerpos monoclonales contra radionúclidos directos, toxinas u otros agentes terapéuticos ofrece la posibilidad de que dichos agentes se puedan administrar de forma selectiva en las zonas tumorales, limitando de este modo la toxicidad a los tejidos normales.

40 Los anticuerpos contra el antígeno CD20 se han investigado para la terapia de los linfomas con linfocitos B. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD20 híbrido, denominado "IDE-C2B8", presenta actividad contra los linfomas por linfocitos B cuando se suministra en forma de anticuerpos no conjugados en inyecciones repetidas de dosis que superan los 500 mg por inyección. Maloney *et al.*, *Blood* 84:2457 (1994); Longo, *Curr. Opin. Oncol.* 8:353 (1996). Aproximadamente el 50 por ciento de los pacientes distintos del de Hodgkin, que presentan la forma poco activa en bajo grado, tratados con este régimen presentaban respuestas. Las respuestas terapéuticas se han obtenido también utilizando anticuerpo monoclonal murino anti-CD-20 de B1 marcado con ^{131}I cuando se administraban dosis repetidas que superaban los 600 mg por inyección. Kaminski *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 329:459 (1993); Press *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 329:1219 (1993); Press *et al.*, *Lancet* 346:336 (1995). Sin embargo, estos anticuerpos, si se suministran como formas no conjugadas o formas radiomarcadas no han presentado respuestas objetivas en pacientes con la forma más corriente y letal del linfoma por linfocitos B, el producto intermedio o el tipo agresivo.

55 Por consiguiente, es necesario desarrollar una inmunoterapia para la malignidad de linfocitos B que permita la administración repetida de dosis comparativamente bajas de un anticuerpo, y que no esté limitada por la necesidad de añadir un agente tóxico para conseguir una respuesta terapéutica de duración significativa.

Sumario de la invención

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar la utilización de por lo menos un anticuerpo anti-CD22 completo que no esté conjugado con un agente íntegro del mismo, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la malignidad de linfocitos B.

Otro objetivo adicional de la presente invención consiste en proporcionar la utilización en la que bajas dosis de anticuerpos anti-CD22 se complementan con la administración de una proteína terapéutica, tal como un inmunoconjungado o una proteína de fusión del anticuerpo, o mediante un régimen quimioterapéutico.

Estos y otros objetivos se consiguen, según una forma de realización de la presente invención, mediante el suministro de un anticuerpo anti-CD22 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada**1. Vista general**

5 Tal como se expuso anteriormente, los anticuerpos anti-CD20, ya sean no conjugados o marcados con un radio-núclido terapéutico, no han podido proporcionar respuestas objetivas en pacientes con formas intermedias o agresivas de linfoma por linfocitos B. Sorprendentemente, los estudios clínicos en pacientes con linfoma distinto del de Hodgkin (ambas formas poco activas y agresivas) o leucemia linfática aguda han demostrado que dosis relativamente bajas (es decir, 20 a 100 mg de proteína por dosis) de anticuerpo anti-CD22 murino o humanizado no conjugado, denominado “EPB-2” o “LL2”, pueden producir remisiones parciales o completas que duran hasta 24 meses. Esto, a pesar del hecho de que dichos pacientes están a menudo en recaída tras múltiples ciclos de quimioterapia agresiva e incluso tras el trasplante de médula ósea. Los resultados positivos con anticuerpos anti-CD22 no conjugados son particularmente sorprendentes en pacientes avanzados con la forma agresiva (intermedia) de linfoma distinto del de Hodgkin y en la leucemia linfática crónica y aguda, ya que los anticuerpos anti-CD20 no conjugados o radio-marcados no han podido presentar tales efectos, particularmente a bajas dosis de proteína. Además, los resultados positivos con los anticuerpos anti-CD22 no son de esperar a la vista del informe de Freedman, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 4:405 (1990), de que las leucemias linfocíticas crónicas de tipo linfocitos B no expresan generalmente a CD22.

20 2. Definiciones

En la descripción siguiente, se utilizan extensamente numerosos términos. Para facilitar la comprensión de la invención se proporcionan las siguientes definiciones.

25 Un *gen estructural* es una secuencia de ADN que se transcribe en el ARN mensajero (ARNm) que se traduce a continuación en una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

30 Un *activador* es una secuencia de ADN que dirige la transcripción de un gen estructural. Normalmente, se sitúa un activador en la zona 5' de un gen, próximo al punto de partida de la transcripción de un gen estructural. Si un activador es un activador inducible, entonces la velocidad de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. En cambio, la velocidad de transcripción no está regulada por un agente inductor si el activador es un activador esencial.

35 Una *molécula de ADN aislada* es un fragmento de ADN que no está integrado en un ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, un gen del anticuerpo clonado es un fragmento de ADN que ha sido separado del ADN genómico de una célula de mamífero. Otro ejemplo de una molécula de ADN aislada es una molécula de ADN sintetizada químicamente que no está integrada en el ADN genómico de un organismo.

40 Un *potenciador* es un elemento regulador de ADN que puede aumentar la eficacia de la transcripción, independientemente de la distancia u orientación del potenciador con respecto al punto de partida de la transcripción.

45 *ADN complementario* (ADNc) es una molécula de ADN de una sola cadena que forma la enzima transcriptasa inversa a partir de una plantilla de ARNm. Normalmente, para la iniciación de la transcripción inversa se emplea un cebador complementario de las partes de ARNm. Los expertos en la materia utilizan también el término “ADNc” para referirse a la molécula de ADN de doble cadena que consiste en dicha molécula de ADN de una sola cadena y en su cadena de ADN complementaria.

50 El término *expresión* se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en el ARNm y la traducción del ARNm en uno o más polipéptidos.

55 Un *vector de clonación* es una molécula de ADN, tal como un plásmido, cósmido o bacteriófago, que tiene capacidad de replicación de forma autónoma en una célula anfitriona. Los vectores de clonación contienen normalmente uno o un número pequeño de puntos de reconocimiento de la endonucleasa de restricción en la que se pueden insertar las secuencias de ADN extrañas de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como un gen marcador que es adecuado para su utilización en la identificación y selección de las células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores incluyen normalmente genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o resistencia a la ampicilina.

60 Un *vector de expresión* es una molécula de ADN que comprende un gen que se expresa en una célula anfitriona. Normalmente, la expresión del gen se sitúa bajo el control de determinados elementos reguladores, incluyendo activadores esenciales o inducibles, elementos reguladores específicos para el tejido y potenciadores. Dicho gen se dice que está “operativamente ligado a” los elementos reguladores.

65 Un *anfitrión recombinante* puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica que contenga un vector de clonación o un vector de expresión. Esta expresión incluye también a las células procarióticas o eucarióticas que han sido modificadas genéticamente para contener el/los gen(es) clonado(s) en el cromosoma o genoma de la célula anfitriona.

Un fragmento de anticuerpo es una parte de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une al mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo íntegro. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-CD22 se une a un epítopo de CD22.

5 La expresión "fragmento de anticuerpo" incluye asimismo cualquier proteína sintética o modificada genéticamente que actúe como anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos aislados consistentes en una zona variable de cadena ligera, los fragmentos "Fv" consistentes en zonas variables de cadenas pesada y ligera, moléculas de polipéptido de una sola cadena recombinante en las que las zonas variables ligera y pesada están conectadas por un enlace péptido ("proteínas sFv"), y las unidades 10 de reconocimiento mínimas consistentes en los restos de aminoácidos que simulan la zona hipervariable.

Un anticuerpo híbrido es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las zonas determinantes complementarias procedentes de un anticuerpo de roedor, mientras que el resto de la molécula de anticuerpos procede de un anticuerpo humano.

15 Anticuerpos humanizados son proteínas recombinantes en las que las zonas determinantes de complementariedad murina de un anticuerpo monoclonal han sido transferidas desde las cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina murina a un dominio variable humano.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, un agente terapéutico es una molécula o átomo que está conjugado con un fragmento de anticuerpo para producir un conjugado que es útil en terapia. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen los fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro y agentes fotoactivos o colorantes.

25 Un anticuerpo desnudo es un anticuerpo completo, opuesto a un fragmento de anticuerpo, que no está conjugado con un agente terapéutico. Los anticuerpos desnudos incluyen tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales, así como determinados anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos híbridos y humanizados.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término componente del anticuerpo incluye tanto un anticuerpo completo como un fragmento de anticuerpo.

30 Un inmunoconjunto es un conjugado de un componente del anticuerpo con un agente terapéutico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término proteína de fusión del anticuerpo se refiere a una molécula recombinante que comprende un componente del anticuerpo y un agente terapéutico. Ejemplos de agentes terapéuticos adecuados para dichas proteínas de fusión incluyen los inmunomoduladores ("proteína de fusión anticuerpo-inmunomodulador") y toxinas ("proteína de fusión anticuerpo y toxina").

3. Producción de anticuerpos monoclonales anti-CD22, anticuerpos humanizados, anticuerpos de primate y anticuerpos humanos

40 Los anticuerpos monoclonales de roedor contra CD22 se pueden obtener por los procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Véase en general, 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) ["Colligan"]. En resumen, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener inyectando a ratones con una composición 45 que comprende CD22, modificando la presencia de la producción de anticuerpos extrayendo una muestra de suero, extirpando el bazo para obtener los linfocitos B, fusionando los linfocitos B con las células del mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando los clones positivos que producen anticuerpos anti-CD22, cultivando los clones que producen anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

50 Se pueden aislar anticuerpos monoclonales y purificar de los cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien probadas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen la cromatografía por afinidad con Proteína-A Sepharose, cromatografía por exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y en las páginas 2.9.1 a 2.9.3. Asimismo, véase Baines *et al.*, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, VOL. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

55 Se pueden obtener cantidades adecuadas del antígeno CD22 bien caracterizado para la producción de anticuerpos utilizando técnicas normalizadas. Como ejemplo, se puede inmunoprecipitar el CD22 a partir de la proteína del linfocito B utilizando los anticuerpos depositados descritos por Tedder *et al.*, patente US nº 5.484.892 (1996).

60 Como alternativa, se puede obtener la proteína CD22 a partir de células cultivadas transfectadas que sobreproducen CD22. Los vectores de expresión que comprenden las moléculas de ADN que codifican las proteínas CD22 se pueden construir utilizando las secuencias publicadas de nucleótidos de CD22. Véase, por ejemplo, Wilson *et al.*, *J. Exp. Med.* 173:137 (1991); Wilson *et al.*, *J. Immunol.* 150:5013 (1993). A título ilustrativo, se pueden obtener moléculas de ADN que codifican CD22 sintetizando las moléculas de ADN que utilizan oligonucleótidos largos que se ceban mutuamente. 65 Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, (eds.), *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, páginas 8.2.8 a 8.2.13 (1990) ["Ausubel"]. Además, véase Wosnick *et al.*, *Gene* 60:115 (1987); y Ausubel *et al.* (eds.), *SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, 3^a edición, páginas 8-8 a 8-9 (John Wiley & Sons, Inc. 1995). Las técnicas demostradas que utilizan la reacción en cadena de polimerasa proporcionan la capacidad para sintetizar genes tan

largos como de 1,8 kilobases de longitud. Adang *et al.*, *Plant Molec. Biol.* 21:1131 (1993); Bambot *et al.*, *PCR Methods and Applications* 2:266 (1993); Dillon *et al.*, "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", en *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Vol. 15: *PCR PROTOCOLS: CURRENT METHODS AND APPLICATIONS*, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc. 1993).

5

En una variación de este método, se puede obtener el anticuerpo monoclonal anti-CD22 fusionando las células de mieloma con las células del bazo de ratones inmunizados con una línea de linfocitos pre-B murina transfectada de forma estable con ADNc de CD22. Véase Tedder *et al.*, patente US nº 5.484.892 (1996).

- 10 Un ejemplo de un anticuerpo monoclonal anti-CD22 murino adecuado es el anticuerpo monoclonal LL2 (anteriormente EPB-2), que se produjo contra las células Raji humanas procedentes de un linfoma de Burkitt. Pawlak-Byczkowska *et al.*, *Cancer Res.* 49:4568 (1989). Este anticuerpo monoclonal posee un isótopo de IgG_{2a}, y el anticuerpo se introduce rápidamente en las células del linfoma. Shih *et al.*, *Int. J. Cancer* 56:538 (1994). Los estudios de inmunotinción y de radioinmunodetección *in vivo* han demostrado la excelente sensibilidad de LL2 en la detección de los linfomas con linfocitos B. Pawlak-Byczkowska *et al.*, *Cancer Res.* 49:4568 (1989); Murthy *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med.* 19:394 (1992). Además, los fragmentos de LL2-Fab' marcados con ^{99m}Tc han demostrado ser útiles en la estadificación por incremento de los linfomas por linfocitos B, mientras que los fragmentos LL2 íntegros marcados con ¹³¹I y F(ab')₂ de LL2 marcados se han utilizado en las zonas del linfoma diana y para producir respuestas terapéuticas. Murthy *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med.* 19:394 (1992); Mills *et al.*, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 34:479 (1993) [Abstract 2857]; Baum *et al.*, *Cancer* 73 (Supl. 3):896 (1994); Goldenberg *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 9:548 (1991). Además, los fragmentos LL2 de Fab' conjugados con un derivado de exotoxina de *Pseudomonas* han demostrado que producen remisiones completas para los xenotransplantes de linfoma humano mensurables que se desarrollan en ratones lampíos. Kreitman *et al.*, *Cancer Res.* 53:819 (1993).
- 25 En una forma de realización adicional, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo híbrido en el que las zonas variables de un anticuerpo humano se han sustituido por las zonas variables de un anticuerpo anti-CD22 de roedor. Las ventajas de los anticuerpos híbridos incluyen la inmunogenicidad disminuida y la estabilidad aumentada *in vivo*.
- 30 Las técnicas para la construcción de anticuerpos híbridos son bien conocidas por los expertos en la materia. Como ejemplo, Leung *et al.*, *Hybridoma* 13:469 (1994), describen cómo produjeron un híbrido de LL2 combinando las secuencias de ADN que codifican los dominios V_g y V_H del anticuerpo monoclonal de LL2 con los respectivos dominios humanos de la zona constante de κ e IgG₁. Esta publicación proporciona asimismo las secuencias de nucleótidos de las zonas variables de las cadenas ligera y pesada de LL2, V_d y V_H, respectivamente.
- 35 En otra forma de realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de primate subhumano. Las técnicas generales para aumentar los anticuerpos terapéuticamente útiles en los mandíbulas se pueden encontrar, por ejemplo, en Goldenberg *et al.*, publicación de patente internacional nº WO 91/11465 (1991), y en Losman *et al.*, *Int. J. Cancer* 46:310 (1990).
- 40 Todavía en otra forma de realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal "humanizado". Esto es, las zonas determinantes de complementariedad del ratón se transfieren desde las cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano, seguido de la sustitución de algunos restos humanos en las zonas de la estructura de sus contrapartidas murinas. Los anticuerpos monoclonales humanizados según la presente invención son adecuados para su utilización en los procedimientos terapéuticos. Las técnicas generales para la clonación de los dominios variables de la inmunoglobulina murina se describen, por ejemplo, en la publicación de Orlandi *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 86:3833 (1989). Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados se describen, por ejemplo, en Jones *et al.*, *Nature* 321:522 (1986), Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988), Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534 (1988), Carter *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437 (1992), y Singer *et al.*, *J. Immun.* 150:2844 (1993). La publicación de Leung *et al.*, *Mol. Immunol.* 32:1413 (1995), describe la construcción del anticuerpo LL2 humanizado.

55 En otra forma de realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humanizado. Dichos anticuerpos se obtienen a partir de ratones transgénicos que se han "modificado genéticamente" para producir anticuerpos específicos en respuesta a una prueba de provocación antigenica. En esta técnica, los elementos del locus de la cadena pesada y ligera humana se introducen en las cepas de ratones procedentes de las líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones dirigidas de los locus de la cadena pesada y de la cadena ligera endógenas. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos y se pueden utilizar ratones para producir hibridomas humanos que segreguen anticuerpos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos están descritos por Green *et al.*, *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856 (1994), y Taylor *et al.*, *Int. Immun.* 6:579 (1994).

4. Producción de fragmentos de anticuerpos

65 La presente invención contempla la utilización de fragmentos de anticuerpos anti-CD22 u otros anticuerpos terapéuticamente útiles. Los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar por hidrólisis proteolítica de un anticuerpo o por expresión en *E. coli* del ADN que codifica el fragmento.

Se pueden obtener fragmentos de anticuerpo por digestión de anticuerpos completos con pepsina o papaína por los procedimientos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpo por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de 5S denominado $F(ab')_2$. Este fragmento se puede escindir más utilizando un agente reductor de tiol y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de los enlaces disulfuro, para producir los fragmentos monovalentes Fab' de 3,5S. Como alternativa, una escisión enzimática que utiliza pepsina produce directamente dos fragmentos monovalentes Fab y un fragmento Fc . Estos procedimientos están descritos, por ejemplo, por Goldenberg, en las patentes US nº 4.036.945 y nº 4.331.647 y en las referencias contenidas en las mismas. También, véase Nisonoff *et al.*, *Arch Biochem Biophys.* 89:230 (1960); Porter, *Biochem. J.* 73:119 (1959), Edelman *et al.*, en *METHODS IN ENZYMOLOGY* VOL. 1, página 422 (Academic Press 1967), y Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

Se pueden también utilizar otros procedimientos de escisión de anticuerpos, tal como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, además de la escisión de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, con tal que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo íntegro.

Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de las cadenas V_H y V_L . Esta asociación puede ser no covalente, como la descrita en Inbar *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 69:2659 (1972). Como alternativa, las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas por productos químicos tal como glutaraldehído. Véase, por ejemplo, Sandhu, *supra*.

Preferentemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas de V_H y V_L que están conectadas por un enlace péptido. Estas proteínas (sFv) que se unen al antígeno de una sola cadena se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que se introduce posteriormente en una célula anfítriona, tal como *E. coli*. Las células anfítrionas recombinantes sintetizan una sola cadena de polipéptido con un péptido de enlace que abarca los dos dominios V . Los procedimientos para producir sFvs están descritos, por ejemplo, por Whitlow *et al.*, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97 (1991). Véase también Bird *et al.*, *Science* 242:423 (1988), Ladner *et al.*, patente US nº 4.946.778, Pack *et al.*, *Bio/Technology* 11:1271 (1993), y Sandhu, *supra*.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una sola zona determinante de complementariedad (CDR). Se pueden obtener péptidos de la CDR (“unidades de reconocimiento mínimas”) construyendo los genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan utilizando, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa para sintetizar la zona variable del ARN de las células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick *et al.*, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106 (1991); Courtenay-Luck, “*Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies*”, en *MONOCLOINAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION*, Ritter *et al.* (eds.), páginas 166-179 (Cambridge University Press 1995); y Ward *et al.*, “*Genetic Manipulation and Expression of Antibodies*”, en *MONOCLOINAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS*, Birch *et al.*, (eds.), páginas 137-185 (Wiley-Liss, Inc. 1995).

5. Preparación de inmunoconjungados

La presente invención contempla la utilización de un anticuerpo anti-CD22 desnudo en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una malignidad de linfocitos B en un paciente humano, en la que el medicamento está constituido por (i) un anticuerpo anti-CD22 desnudo solo o (ii) un anticuerpo anti-CD22 desnudo y una proteína terapéutica o un tratamiento quimioterapéutico, en la que dicha proteína terapéutica es seleccionada de entre el grupo constituido por un anticuerpo anti-CD19 o anti-CD20, un inmunoconjungado con un agente terapéutico seleccionado de entre el grupo constituido por fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, y agentes fotoactivos o colorantes, una proteína de fusión de anticuerpo e inmunomodulador y una proteína de fusión de anticuerpo y toxina, siendo el anticuerpo anti-CD22 desnudo utilizado como la composición terapéutica principal para efectuar el tratamiento de la malignidad de linfocitos B. Dichos inmunoconjungados se pueden preparar conjugando indirectamente un agente terapéutico con un componente del anticuerpo. Las técnicas generales están descritas en Shih *et al.*, *Int. J. Cancer* 41:832-839 (1988); Shih *et al.*, *Int. J. Cancer* 46:1101-1106 (1990); y Shih *et al.*, patente US nº 5.057.313. El procedimiento general implica hacer reaccionar un componente del anticuerpo que tiene una parte de carbohidrato oxidada con un polímero portador que tiene por lo menos una función amina libre y que está cargado con multitud de fármacos, toxinas, quelantes, aditivos de boro u otros agentes terapéuticos. Esta reacción produce un enlace de base de Schiff (imina) inicial, que se puede estabilizar por reducción a una amina secundaria para formar el conjungado final.

El polímero portador preferentemente es un aminodextrano o un polipéptido de por lo menos 50 restos de aminoácido, aunque también se pueden utilizar otros portadores de polímeros sustancialmente equivalentes. Preferentemente, el inmunoconjungado final es soluble en una solución acuosa, tal como suero de mamífero, para facilidad de administración y direccionamiento eficaz para su utilización en terapia. De este modo, las funciones solubilizantes en el polímero portador aumentarán la solubilidad en el suero del inmunoconjungado final. En particular, se preferirá un aminodextrano.

El procedimiento para preparar un inmunoconjungado con un portador de aminodextrano comienza normalmente con un polímero de dextrano, ventajosamente un dextrano de peso molecular medio de aproximadamente 10.000 a

100.000. El dextrano se hace reaccionar con un agente oxidante para efectuar una oxidación controlada de una parte de sus anillos de carbohidrato para generar grupos aldehído. La oxidación se efectúa convenientemente con reactivos químicos glucolíticos tales como NaIO_4 , según procedimientos convencionales.

5 El dextrano oxidado se hace reaccionar a continuación con una poliamina, preferentemente una diamina, y más preferentemente, una mono- o polihidroxidiamina. Las aminas adecuadas incluyen la etilendiamina, propilendiamina u otras como las polimetilendiaminas, dietilentriamina o como las poliaminas, 1,3-diamino-2-hidroxipropano u otras como las diaminas o poliaminas hidroxiladas y similares. Se utiliza un exceso de la amina en comparación con los grupos aldehído del dextrano para asegurar la transformación sustancialmente completa de las funciones aldehído a 10 grupos de base de Schiff.

Se utiliza un agente reductor, tal como NaBH_4 , NaBH_3CN o similares, para efectuar la estabilización reductora del producto intermedio de la base de Schiff resultante. El aducto resultante se puede purificar mediante paso a través de una columna de tamaño convencional para eliminar los dextranos reticulados.

15 Se pueden utilizar asimismo otros procedimientos convencionales de modificación de un dextrano para introducir funciones amina, por ejemplo, la reacción con bromuro de cianógeno, seguida de reacción con una diamina.

20 El aminodextrano se hace reaccionar a continuación con un derivado de un determinado fármaco, toxina, quelante, inmunomodulador, aditivo de boro, u otros agentes terapéuticos que se deben cargar, en una forma activada, preferentemente, un derivado activado por carboxilo, preparado por medios convencionales, por ejemplo, utilizando dícclohexilcarbodiímidas (DCC) o una variante soluble en agua de la misma, para formar un aducto intermedio.

25 Como alternativa, se pueden acoplar toxinas de polipéptido tal como la proteína antivírica de la uva de américa o de la cadena A del ricino, y similares, al aminodextrano por condensación con glutaraldehído o por reacción de los grupos carboxilo activados en la proteína con aminas en el aminodextrano.

30 Los quelantes para radiometales o los potenciadores de resonancia magnética son bien conocidos en la técnica. Son típicos los derivados del ácido etilendiamintetraacético (EDTA) y del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Estos quelantes tienen normalmente grupos en la cadena lateral mediante los cuales el quelante se puede unir a un portador. Dichos grupos incluyen, por ejemplo, bencilisotiocianato, mediante el cual el DTPA o el EDTA se pueden acoplar a un grupo amino del portador. Como alternativa, se pueden acoplar grupos carboxilo o grupos aminos o un quelante a un portador por activación o derivación previa y a continuación acoplamiento, todo por medios bien conocidos.

35 Los aditivos de boro, tales como los carboranos, se pueden unir a componentes del anticuerpo por procedimientos convencionales. Por ejemplo, se pueden preparar carboranos con funciones carboxilo o cadenas laterales pendientes, como es bien conocido en la técnica. La unión de dichos carboranos a un portador, por ejemplo, aminodextrano, se puede conseguir por activación de los grupos carboxilo de los carboranos y condensación con aminas en el portador para producir un conjugado intermedio. Dichos conjugados intermedios se unen a continuación a componentes del 40 anticuerpo para producir inmunoconjungados terapéuticamente útiles, tal como se describe a continuación.

45 Se puede utilizar un portador de polipéptido en lugar de aminodextrano, pero el portador del polipéptido puede tener por lo menos 50 restos de aminoácido en la cadena, preferentemente entre 100 y 5000 restos de aminoácido. Por lo menos algunos de los aminoácidos deberían ser restos de lisina o restos de glutamato o de aspartato. Las aminas pendientes de los restos de lisina y los carboxilatos pendientes de glutamina y aspartato son convenientes para unir un fármaco, toxina, inmunomodulador, quelante, aditivo de boro u otro agente terapéutico. Ejemplos de portadores de polipéptido adecuados comprenden polilisina, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, sus copolímeros y los polímeros mixtos de estos aminoácidos y otros, por ejemplo, serinas, para comunicar propiedades deseables de solubilidad al portador e inmunoconjungado cargados resultantes.

50 La conjugación del conjugado intermedio con el componente del anticuerpo se efectúa oxidando la parte de carbohidrato del componente del anticuerpo y haciendo reaccionar los carbonilos del aldehído (y de la cetona) resultantes con los grupos amina restantes en el portador después de la carga de un fármaco, toxina, quelante, inmunomodulador, aditivo de boro u otro agente terapéutico. Como alternativa, se puede unir un conjugado intermedio a un componente 55 del anticuerpo oxidado mediante grupos amina que se han introducido en el conjugado intermedio tras la carga del agente terapéutico. La oxidación se efectúa de modo conveniente ya sea químicamente, por ejemplo, con NaIO_4 u otro reactivo glucolítico, o enzimáticamente, por ejemplo, con neuraminidasa y galactosa-oxidasa. En el caso de un portador de aminodextrano, no todas las aminas del aminodextrano se utilizan normalmente para cargar un agente terapéutico. Las restantes aminas del aminodextrano condensan con el componente oxidado del anticuerpo para formar aductos con la base de Schiff, que se estabilizan a continuación de forma reductora, normalmente con un agente 60 reductor de borohidruro.

65 Se utilizan procedimientos análogos para producir otros inmunoconjungados según la invención. Los portadores de polipéptido cargados poseen preferentemente restos de lisina libre restantes para la condensación con la parte oxidada del carbohidrato de un componente del anticuerpo. Los carboxilos en el portador del polipéptido pueden, si es necesario, transformarse en aminas, por ejemplo, por activación con DCC y reacción con un exceso de una diamina.

El inmunoconjungado final se purifica utilizando técnicas convencionales, tales como cromatografía por tamaño o Sephadryl S-300.

Como alternativa, los inmunoconjungados se pueden preparar directamente conjugando un componente del anticuerpo con un agente terapéutico. El procedimiento general es análogo al procedimiento indirecto de conjugación excepto que un agente terapéutico se une directamente a un componente oxidado del anticuerpo.

Se valorará que se puedan sustituir otros agentes terapéuticos por los quelantes descritos en la presente memoria. Los expertos en la materia podrán idear esquemas de conjugación sin la indebida experimentación.

A título ilustrativo adicional, un agente terapéutico se puede unir en una zona bisagra de un componente reducido del anticuerpo mediante la formación de un enlace disulfuro. Por ejemplo, se pueden construir péptidos de la vacuna antitetánica con un solo resto de cisteína que se utiliza para unir el péptido a un componente del anticuerpo. Como alternativa, dichos péptidos se pueden unir al componente del anticuerpo utilizando una reticulación heterobifuncional, tal como 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinilo (SPDP). Yu *et al.*, *Int. J. Cancer* 56:244 (1994). Las técnicas generales para dicha conjugación son bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Wong, *CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING* (CRC Press 1991); Upeslasis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods", en *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS*, Birch *et al.* (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", en *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION*, Ritter *et al.* (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995).

Como se describió anteriormente, se pueden utilizar fracciones de carbohidrato en la zona Fc de un anticuerpo para conjugar un agente terapéutico. Sin embargo, la zona Fc está ausente si se utiliza un fragmento de anticuerpo como componente del anticuerpo del inmunoconjungado. No obstante, es posible introducir un fragmento de carbohidrato en la zona variable de la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Véase, por ejemplo, Leung *et al.*, *J. Immunol.* 154:5919 (1995); Hansen *et al.*, patente US nº 5.443.953 (1995). El fragmento de carbohidrato modificado genéticamente se utiliza a continuación para unirse a un agente terapéutico.

Además, los expertos en la materia reconocerán numerosas variaciones posibles de los procedimientos de conjugación. Por ejemplo, se puede utilizar el fragmento de carbohidrato para unir polietilenglicol con el fin de prolongar la vida media de un anticuerpo íntegro, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en la sangre, linfa u otros fluidos extracelulares. Además, es posible construir un "inmunoconjungado divalente" uniendo agentes terapéuticos a un fragmento de carbohidrato y a un grupo sulfitidrilo libre. Dicho grupo sulfitidrilo libre puede estar situado en la zona bisagra del componente del anticuerpo.

6. Utilización terapéutica de anticuerpos anti-CD22 en regímenes simples y multimodales

La presente invención contempla la utilización de anticuerpos anti-CD22 desnudos como la composición terapéutica primaria para el tratamiento de la malignidad de linfocitos B. Dicha composición puede contener anticuerpos anti-CD22 policlonales o anticuerpos anti-CD22 monoclonales.

Además, una composición terapéutica de la presente invención puede contener una mezcla de anticuerpos anti-CD22 monoclonales dirigida a diferentes epítopos de CD22 no bloqueantes. Los estudios de inhibición cruzada del anticuerpo monoclonal han identificado cinco epítopos en CD22, denominados epítopos A-E. Véase, por ejemplo, Schwartz-Albiez *et al.*, "The Carbohydrate Moiety of the CD22 Antigen Can Be Modulated by Inhibitors of the Glycosylation Pathway", en *LEUKOCYTE TYPING IV. WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS*, Knapp *et al.* (eds.), pág. 65 (Oxford University Press 1989). A título ilustrativo, el anticuerpo LL2 se une con el epítopo B. Stein *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 37:293 (1993). Por consiguiente, la presente invención contempla composiciones terapéuticas que comprenden una mezcla de anticuerpos anti-CD22 monoclonales que se unen por lo menos a dos epítopos de CD22. Por ejemplo, dicha mezcla puede contener anticuerpos monoclonales que se unen al menos con dos epítopos CD22 seleccionados de entre el grupo constituido por el epítopo A, epítopo B, epítopo C, epítopo D y epítopo E.

Los procedimientos para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo anti-CD22 son bien conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos generales son proporcionados, por ejemplo, por Mole, "Epitope Mapping", en *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, VOLUMEN 10: *IMMUNOCHEMICAL PROTOCOLS*, Manson (ed.), páginas 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992). Más específicamente, los ensayos competitivos de bloqueo para determinar la especificidad del epítopo de CD22 están descritos por Stein *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 37:293 (1993), y por Tedder *et al.*, patente US nº 5.484.892 (1996).

La patente de Tedder describe además la producción de mutantes de CD22 que carecen de uno o más dominios de tipo inmunoglobulina. Estas proteínas mutantes se utilizaron para determinar que los dominios 1, 2, 3 y 4 de tipo inmunoglobulina se corresponden con los epítopos A, D, B y C, respectivamente. Así pues, la especificidad del epítopo de CD22 se puede identificar también uniendo un anticuerpo del ensayo con un panel de proteínas de CD22 que carecen del particular dominio de tipo inmunoglobulina.

5 Aunque los anticuerpos anti-CD22 desnudos constituyen la composición terapéutica principal para el tratamiento de la malignidad de linfocitos B, se puede mejorar la eficacia de dicha terapia con anticuerpo anti-CD22 complementando los anticuerpos desnudos con inmunoconjungados y otras formas de terapia complementaria descritas en la presente memoria. En dichos resúmenes multimodales, se pueden administrar composiciones terapéuticas complementarias antes, simultáneamente o después de la administración de anticuerpos anti-CD22 desnudos.

10 Las composiciones terapéuticas descritas en la presente memoria son particularmente útiles para el tratamiento de formas poco activas de linfomas por linfocitos B, formas agresivas de linfomas por linfocitos B, leucemias linfáticas crónicas y leucemias linfáticas agudas. Por ejemplo, se pueden utilizar componentes del anticuerpo anti-CD22 e inmunoconjungados para tratar tanto las formas poco activas como las agresivas del linfoma distinto del de Hodgkin.

15 Como alternativa, se pueden unir aditivos de boros tales como los carboranos a componentes del anticuerpo, tal como se expuso anteriormente.

20 25 Además, los inmunoconjungados terapéuticos pueden comprender un fragmento inmunomodulador. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunomodulador" incluye citocinas, factores de crecimiento de células madre, linfotoxinas, tal como el factor de la necrosis tumoral (TNF), y factores hematopoyéticos, tales como las interleucinas (por ejemplo, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10 e IL-12), los factores estimulantes de colonias (por ejemplo el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)), interferones (por ejemplo, interferones- α , - β y - γ), el factor de crecimiento de células madre denominado "factor S1", eritropoyetina y trombopoyetina. Ejemplos de fragmentos inmunomoduladores adecuados comprenden IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, interferón- α , TNF- α y similares.

30 Una forma relacionada de proteína terapéutica es una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo y un fragmento de inmunomodulador. Los fragmentos de anticuerpo útiles comprenden los componentes del anticuerpo que se unen con CD19, CD20 o CD22.

35 Los procedimientos de preparación de proteínas de fusión de anticuerpo e inmunomodulador son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las proteínas de fusión del anticuerpo que comprenden un fragmento de interleucina-2 están descritas por Boleti *et al.*, *Ann. Oncol.* 6:945 (1995), Nicolet *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 2:161 (1995), Becker *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 93:7826 (1996), Hank *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2:1951 (1996), y Hu *et al.*, *Cancer Res.* 56:4998 (1996). Además, Yang *et al.*, *Hum. Antibodies Hybridomas* 6:129 (1995), describe una proteína de fusión que comprende un fragmento F(ab')₂ y un fragmento alfa del factor de la necrosis tumoral. Además, la utilización terapéutica de una proteína de fusión hLL2-IL-2 está ilustrada en el Ejemplo 3 de la presente solicitud.

40 45 Dichos inmunoconjungados y las proteínas de fusión del anticuerpo e inmunomodulador proporcionan medios para administrar un inmunomodulador a una célula diana y son particularmente útiles contra las células tumorales. Los efectos citotóxicos de los inmunomoduladores son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Klegerman *et al.*, "Lymphokines and Monokines", en BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY, Pessuto *et al.* (eds.), páginas 53-70 (Chapman & Hall 1993). A título ilustrativo, los interferones pueden inhibir la proliferación celular provocando el aumento de expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I en la superficie de varias células y de este modo, aumentar la tasa de destrucción de las células por los linfocitos T citotóxicos. Además, los factores de necrosis tumoral, tal como TNF- α , se cree que producen efectos citotóxicos provocando la fragmentación del ADN.

50 55 Además, pueden prepararse inmunoconjungados terapéuticamente útiles en los cuales un componente del anticuerpo se conjuga con una toxina o con un fármaco quimioterapéutico. Son ilustrativos de las toxinas que se crean de forma adecuada en la preparación de dichos conjugados el ricino, la abrina, la ribonucleasa, la ADNasa I, la enterotoxina A *Staphylococcal*, la proteína antivírica de la uva de América, la gelonina, la toxina de difterina, la exotoxina de *Pseudomonas* y la endotoxina de *Pseudomonas*. Véase, por ejemplo, Pastan *et al.*, *Cell* 47:641 (1986), y Goldenberg, *CA-A Cancer Journal for Clinicians* 44:43 (1994). Los expertos en la materia conocen otras toxinas adecuadas.

60 65 Las proteínas de fusión de anticuerpo y toxina proporcionan un método alternativo para introducir la combinación de anticuerpo terapéutico y toxina. Una proteína de fusión de anticuerpo y toxina es una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo y un fragmento de toxina. Los fragmentos de anticuerpo útiles incluyen los componentes de anticuerpo que se unen con CD19, CD20 o CD22. Los procedimientos para preparar proteínas de fusión de anticuerpo y toxina son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las proteínas de fusión de la exotoxina A de anticuerpo y *Pseudomonas* han sido descritas por Chaudhary *et al.*, *Nature* 339:394 (1989), Brinkmann *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 88:8616 (1991), Batra *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:5867 (1992), Friedman *et al.*, *J. Immunol.* 150:3054 (1993), Wels *et al.*, *Int. J. Can.* 60:137 (1995), Fominaya *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:10560 (1996), Kuan *et al.*, *Biochemistry* 35:2872 (1996), y Schmidt *et al.*, *Int. J. Can.* 65:538 (1996). Las proteínas de fusión de anticuerpo y toxina que contienen un fragmento de toxina de difteria han sido descritas por Kreitman *et al.*, *Leukemia* 7:553 (1993), Nicholls *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:5302 (1993), Thompson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:28037 (1995), y Vallera *et al.*, *Blood* 88:2342 (1996). Deonarain *et al.*, *Tumor Targeting* 1:177 (1995), ha descrito una proteína de fusión de anticuerpo y toxina con un fragmento de ARNasa, mientras que Linardou *et al.*, *Cell Biophys.* 24-25:243 (1994), produjo una proteína de fusión de anticuerpo y toxina que comprende un componente de ADNasa I. Se utilizó gelonina como fragmento de toxina en la proteína de fusión de anticuerpo y toxina de Wang *et al.*, *Abstracts of the 209th ACS National Meeting*, Anaheim, CA, 2-6 abril, 1995, parte 1, BIOT005. Como ejemplo

adicional, Dohlsten *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91:8945 (1994), describió una proteína de fusión de anticuerpo y toxina que comprende la enterotoxina-A *Staphylococcal*.

Los fármacos quimioterapéuticos para el cáncer útiles para la preparación de inmunoconjungados comprenden las mostazas de nitrógeno, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triazenos, análogos del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, antibióticos, epipodofilotoxinas, complejos de coordinación de platino, hormonas y similares. Los agentes quimioterapéuticos adecuados están descritos en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19^a ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS de Goodman y Gilman, 7^a ed. (MacMillan Publishing Co. 1985). Los expertos en la materia conocen otros agentes quimioterapéuticos adecuados, tales como los fármacos experimentales.

Además, se pueden obtener inmunoconjungados terapéuticamente útiles conjugando agentes fotoactivos o colorantes con un compuesto del anticuerpo. Se han utilizado fluorescentes y otros cromógenos, o colorantes, tales como las porfirinas sensibles a la luz visible, para detectar y tratar lesiones dirigiendo la luz adecuada a la lesión. En la terapia, esto se ha denominado fotorradiación, fototerapia o terapia fotodinámica (Jori *et al.* (eds.), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES (Librería Progetto 1985); van den Bergh, *Chem. Britain* 22:430 (1986)). Además, se han acoplado anticuerpos monoclonales con colorantes fotoactivados para conseguir la fototerapia. Mew *et al.*, *J. Immunol.* 130:1473 (1983); *idem.*, *Cancer Res.* 45:4380 (1985); Oseroff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8744 (1986); *idem.*, *Photochem. Photobiol.* 46:83 (1987); Hasan *et al.*, *Prog. Clin. Biol. Res.* 288:471 (1989); Tatsuta *et al.*, *Lasers Surg. Med.* 9:422 (1989); Pelegrin *et al.*, *Cancer* 67:2529 (1991). Sin embargo, estos primeros estudios no incluían la utilización de las aplicaciones de la terapia endoscópica, especialmente en la utilización de fragmentos o subfragmentos de anticuerpos. Por lo tanto, la presente invención contempla la utilización terapéutica de inmunoconjungados que comprenden agentes fotoactivos o colorantes.

Las terapias multimodales de la presente invención comprenden además la inmunoterapia con anticuerpos anti-CD22 desnudos complementados con la administración de anticuerpos anti-CD19 o anti-CD20 en forma de anticuerpos desnudos o como inmunoconjungados. Los anticuerpos anti-CD19 y anti-CD20 son conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Ghetie *et al.*, *Cancer Res.* 48:2610 (1988); Hekman *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 32:364 (1991); Kaminski *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 329:459 (1993); Press *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 329:1219 (1993); Maloney *et al.*, *Blood* 84:2457 (1994); Press *et al.*, *Lancet* 346:336 (1995); Longo, *Curr. Opin. Oncol.* 8:353 (1996).

En otra forma de terapia multimodal, los pacientes reciben anticuerpos anti-CD22 desnudos y quimioterapia para el cáncer habitual. Por ejemplo, "CVB" (1,5 g/m² de ciclofosfamida, 200 a 400 mg/m² de etopósido y 150 a 200 mg/m² de carmustina) es un régimen utilizado para tratar linfoma distinto del de Hodgkin. Patti *et al.*, *Eur. J. Haematol.* 51:18 (1993). Otros regímenes quimioterapéuticos por combinación adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Freedman *et al.*, "Non-Hodgkin's Lymphomas", en CANCER MEDICINE, VOLUMEN 2, 3^a edición, Holland *et al.* (eds.), páginas 2028-2068 (Lea y Febiger 1993). A título ilustrativo, los regímenes quimioterapéuticos de primera generación para el tratamiento del grado intermedio del linfoma distinto del Hodgkin comprenden C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazina y prednisona) y CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona). Un régimen quimioterapéutico de segunda generación útil es m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona y leucovorina), mientras que un régimen de tercera generación adecuado es MACOP-B (metotrexato, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicin y leucovorina). Los fármacos útiles adicionales incluyen butirato de fenilo y brostatina-1.

En general, la dosificación de los anticuerpos anti-CD22, de los componentes del anticuerpo anti-CD22, de los inmunoconjungados y de las proteínas de fusión administrados variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, la enfermedad general y los antecedentes médicos anteriores del paciente. Normalmente, es deseable proporcionar al receptor una dosis de componente del anticuerpo, inmunoconjungado o proteína de fusión que esté comprendida en el intervalo entre 1 pg/kg y 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque también se puede administrar una dosificación menor o mayor según determinen las circunstancias.

La administración de componentes del anticuerpo, inmunoconjungados o proteínas de fusión a un paciente puede ser intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, por perfusión a través de un catéter en la zona o por inyección directa en el interior de la lesión. Cuando se administran proteínas terapéuticas por inyección, la administración puede ser por infusión continua o a emboladas individuales o múltiples.

Los expertos en la materia están al corriente de que la inyección intravenosa proporciona un modo útil de administración debido a la perfección de la circulación en los anticuerpos que se distribuyen rápidamente. La administración intravenosa, sin embargo, está sometida a la limitación mediante una barrera vascular que comprende las células endoteliales de los vasos sanguíneos y la matriz subendotelial. Todavía, la barrera vascular es el problema más notable para la absorción de los anticuerpos terapéuticos por los tumores sólidos. Los linfomas tienen velocidades de flujo de la sangre relativamente elevadas, contribuyendo a la administración eficaz del anticuerpo. Las vías intralinfáticas de administración, tales como la subcutánea o la inyección intramuscular, o por catherización de vasos linfáticos, proporcionan asimismo un medio útil de tratamiento de los linfomas.

Preferentemente, se pueden administrar anticuerpos anti-CD22 desnudos a bajas dosis de proteína, tales como de 20 a 100 miligramos de proteína por dosis, administrados una vez, o de forma repetida, por vía parenteral. Como

alternativa, se administran anticuerpos anti-CD22 desnudos en dosis de 30 a 90 miligramos de proteína por dosis, de 40 a 80 miligramos de proteína por dosis, o de 50 a 70 miligramos de proteína por dosis.

5 Los inmunoconjungados que poseen un portador cargado con aditivo para la terapia térmica por activación de neutrones normalmente se efectuarán de modo similares. Sin embargo, presenta ventajas esperar hasta que el inmunoconjungado no direccional se purifique antes que se lleve a cabo la irradiación con neutrones. La purificación se puede acelerar utilizando un anticuerpo que se une al inmunoconjungado. Véase la patente US nº 4.624.846 para una descripción de este principio general.

10 Se pueden formular componentes del anticuerpo anti-CD22, inmunoconjungados y proteínas de fusión de la presente invención según procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, de este modo las proteínas se combinan en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "portador farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. La solución salina esterilizada tamponada con fosfato es un ejemplo de portador farmacéuticamente aceptable. Otros 15 portadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19^a ed. (1995).

20 Con fines terapéuticos, los componentes del anticuerpo (o inmunoconjungados/proteínas de fusión) y un portador farmacéuticamente aceptable se deben administrar a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una combinación de un componente del anticuerpo, opcionalmente con un inmunoconjungado/proteína de fusión y un portador farmacéuticamente aceptable se dice que se debe administrar en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia produce 25 un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. En el presente contexto, un agente es fisiológicamente significativo si su presencia produce la inhibición del crecimiento de las células diana del tumor.

25 Se pueden emplear procedimientos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción de un componente del anticuerpo, inmunoconjungado o proteína de fusión en una aplicación terapéutica. Las preparaciones de liberación controlada se pueden preparar mediante la utilización de polímeros para acomplejar o adsorber el componente del anticuerpo, inmunoconjungado o proteína de fusión. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles comprenden 30 las matrices de poli(acetato de etileno-co-vinilo) y las matrices de un copolímero de polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebálico. Sherwood *et al.*, *Bio/Technology* 10:1446 (1992). El ritmo de liberación de un componente del anticuerpo (o inmunoconjungado) de dicha matriz depende del peso molecular de la proteína, de la cantidad de componente del anticuerpo/inmunoconjungado/proteína de fusión en el interior de la matriz y del tamaño de las partículas dispersas. Saltzman *et al.*, *Biophys. J.* 55:163 (1989); Sherwood *et al.*, *supra*. Otras formas de dosificación 35 sólidas se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19^a ed. (1995).

40 La presente invención también contempla una utilización en la que se deben administrar inmunomoduladores para prevenir, mitigar o anular la toxicidad provocada por la radiación o provocada por fármacos de las células normales y especialmente de las células hematopoyéticas. La terapia inmunomoduladora asociada permite la administración de dosis mayores de agentes citotóxicos debido al aumento de tolerancia del mamífero receptor. Además, la terapia inmunomoduladora asociada puede prevenir, paliar o invertir la toxicidad de la médula limitada por la dosis. Ejemplos 45 de inmunomoduladores adecuados para la terapia asociada comprenden G-CSF, GM-CSF, trombopoyetina, IL-1, IL-3, IL-12 y similares. El procedimiento de la terapia inmunomoduladora asociada está descrito por Goldenberg, patente US nº 5.120.525.

45 Por ejemplo, se puede administrar por vía intravenosa o a emboladas IL-2 recombinante a 6×10^5 IU/kg o en infusión continua a una dosis de 18×10^6 IU/m²/d. Weiss *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 10:275 (1992). Como alternativa, se puede administrar IL-2 recombinante por vía subcutánea a una dosis de 12×10^6 IU. Vogelzang *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 11:1809 (1993). Además, se puede administrar INF- γ por vía subcutánea a una dosis de $1,5 \times 10^6$ U. Lienard *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 10:52 (1992). Además, Nadeau *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274:78 (1995), ha demostrado que una sola dosis intravenosa de IL-12 recombinante (42,5 μ g/kilogramo) elevó las concentraciones de IFN- γ en macacos rhesus.

55 Las formulaciones adecuadas de IL-2 comprenden PROLEUKINA (Chiron Corp./Cetus Oncology Corp.; Emeryville, CA) y TECELEUKINA (Hoffmann-La Roche, Inc.; Nutley, NJ). ACTIMMUNE (Genentech, Inc.; South San Francisco, CA) es una preparación adecuada de INF- γ .

60 La presente invención, descrita de este modo en general, se pondrá más claramente de manifiesto al hacer referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a título de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

Ejemplo 1

Tratamiento de un paciente con linfoma distinto del de Hodgkin de grado intermedio con recaída

65 La quimioterapia agresiva anterior consistente en CHOP \times 6, no ha surtido efecto en un paciente con linfoma distinto del de Hodgkin de grado intermedio, lo que condujo a una remisión completa durante cinco meses, otro ciclo de CHOP \times 6, dando como resultado la evolución, D-MOPP \times 2, dando como resultado enfermedad estable durante

ES 2 241 129 T5

seis meses y CVB con trasplante de células madre periféricas, que condujo a una remisión parcial durante cuatro meses. El paciente presenta linfoma cíclico en el pecho y en el ganglio linfático del cuello, que se pueden medir ambos por tomografía computerizada y palpación respectivamente.

5 Se infunde al paciente con 50 mg de anticuerpo monoclonal LL2 humanizado los días 2, 5, 9, 12 de las dos semanas seguidas sin notarse efectos desfavorables. Tres semanas después, la palpación del alargamiento del ganglio del cuello presenta una disminución de aproximadamente el 60% que se puede medir, mientras que una exploración por tomografía computerizada con repetición del pecho presenta una reducción marcada del 70% del tumor. El seguimiento de las mediciones realizado diez semanas tras la terapia no presenta ninguna prueba de la enfermedad en el cuello o
10 en el pecho. Ya que la nueva enfermedad no se detecta en ninguna parte, se considera que el paciente está en completa remisión. Los estudios de seguimiento cada 10 a 12 semanas confirman una completa remisión durante por lo menos 16 meses tras la terapia.

15 Ejemplo 2

Tratamiento de un paciente con linfoma agresivo de células grandes difusas con CHOP y hLL2

20 Un paciente presenta linfoma agresivo con células grandes difusas y se diagnostica que presenta un pronóstico escaso, con abultamiento en el abdomen, otros numerosos puntos de enfermedad extraganglionar y lactato deshidrogenasa (LDH) del suero elevada. Se coloca al paciente en CHOP y después de tres ciclos de terapia, se observa una respuesta parcial con resolución de numerosos puntos de la enfermedad extraganglionar fuera del abdomen. Sin embargo, el abultamiento en el abdomen continúa aumentando en volumen y la LDH del suero continua elevada.

25 Al inicio del tercer ciclo de CHOP, se infunde al paciente con 50 mg de anticuerpo monoclonal LL2 humanizado los días 2, 5, 9 y 12. Este régimen terapéutico de hLL2 se repite simultáneamente con cuatro ciclos más de CHOP. Durante la terapia, la concentración de LDH en el suero disminuye dentro del intervalo normal. Un mes después del tercer ciclo de CHOP y LL2, una exploración por tomografía computerizada del tumor voluminoso en el abdomen presenta más de un 90% de reducción de la masa. Los estudios de seguimientos cada 10 a 12 semanas confirman una
30 reducción completa durante más de 9 meses tras la terapia.

Ejemplo 3

35 Tratamiento de un paciente con linfoma agresivo de células grandes, con recaída, con hLL2 y hLL2-IL2

40 Un paciente con linfoma agresivo de células grandes difusas respondió a la quimioterapia de primera línea (CHOP) y de segunda línea (m-BACOD), pero la quimioterapia de tercera línea (MACOP-B) no surtió efecto. Una vez terminada la quimioterapia de tercera línea, el paciente presenta enfermedad difusa en la médula ósea, esplenomegalia masiva y numerosos puntos de ganglios linfáticos dilatados que podrían palpitarse. A continuación se hace infusión al paciente con 50 mg de LL2 humanizado los días 2, 5, 9 y 12. Este régimen se repite cada semana durante cuatro semanas. La enfermedad de la médula ósea responde de manera evolutiva al tratamiento con hLL2 y el tamaño de los ganglios también disminuye. Sin embargo, muchos ganglios pueden palpitarse todavía y se observa poca disminución en el tamaño
45 del bazo.

50 Aunque la terapia con hLL2 continua cada dos semanas, el paciente recibe también 10 mg de proteína de fusión de hLL2 e IL2. Después del primer tratamiento, existe una disminución profunda del tamaño del bazo, y tras el segundo tratamiento con hLL2/hLL2-IL2, los ganglios no son palpables y el tamaño del bazo ha disminuido más. No se observa ninguna evolución de la enfermedad durante más de seis meses.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un anticuerpo anti-CD22 desnudo en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una malignidad de linfocitos B en un paciente humano, en la que el medicamento está constituido por (i) un anticuerpo anti-CD22 desnudo solo o (ii) un anticuerpo anti-CD22 desnudo y una proteína terapéutica o un tratamiento quimioterapéutico, en la que dicha proteína terapéutica es seleccionada de entre el grupo constituido por un anticuerpo anti-CD19 o anti-CD20, un inmunoconjungado con un agente terapéutico seleccionado de entre el grupo constituido por fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, y agentes fotoactivos o colorantes, una proteína de fusión de anticuerpo e inmunomodulador y una proteína de fusión de anticuerpo y toxina, siendo el anticuerpo anti-CD22 desnudo utilizado como la composición terapéutica principal.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-CD22 desnudo solo es utilizado en la preparación del medicamento.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho anticuerpo anti-CD22 se debe administrar por vía parenteral a una dosis de 20 a 100 miligramos de proteína por dosis.
- 20 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho anticuerpo anti-CD22 se debe administrar a dosis parenterales repetidas de 20 a 100 miligramos de proteína por dosis.
- 25 5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho anticuerpo anti-CD22 se selecciona de entre el grupo constituido por anticuerpo de primate subhumano, anticuerpo monoclonal murino, anticuerpo híbrido y anticuerpo humanizado.
- 30 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho anticuerpo anti-CD22 es el anticuerpo LL2.
- 35 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha malignidad de linfocitos B se selecciona de entre el grupo constituido por formas poco activas de linfomas con linfocitos B, formas agresivas de linfomas con linfocitos B, leucemias linfáticas crónicas y leucemias linfáticas agudas.
- 40 8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha malignidad de linfocitos B es un linfoma no Hodgkin.
- 45 9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho medicamento comprende por lo menos dos anticuerpos monoclonales que se unen con distintos epítopos de CD22, en la que dichos epítopos de CD22 se seleccionan de entre el grupo constituido por el epítopo A, epítopo B, epítopo C, epítopo D y epítopo E.
- 50 10. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha proteína terapéutica es una combinación de por lo menos un anticuerpo anti-CD19 y por lo menos un anticuerpo anti-CD20.
- 55 11. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha proteína terapéutica es un anticuerpo anti-CD19 desnudo o un anticuerpo anti-CD20 desnudo.
- 60 12. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha proteína terapéutica es un inmunoconjungado o una proteína de fusión, en la que dicho inmunoconjungado o proteína de fusión comprende un fragmento inmunomodulador seleccionado de entre el grupo constituido por interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6 e IL-10, IL-12, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos y de granulocitos, y linfotoxina.
- 65 13. Utilización según la reivindicación 12, en la que dicho inmunoconjungado o dicha proteína de fusión de anticuerpo e inmunomodulador se une a un antígeno seleccionado de entre el grupo constituido por CD19, CD20 y CD22.
- 70 14. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho inmunoconjungado comprende un factor estimulante de colonias seleccionado de entre el grupo constituido por el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF).
- 75 15. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha proteína terapéutica es un inmunoconjungado o una proteína de fusión de anticuerpo y toxina que comprende una toxina seleccionada de entre el grupo constituido por ricino, abrina, ribonucleasa, DNasa I, enterotoxina- α *Staphylococcal*, proteína antivírica de la uva de América, gelonina, toxina de difterina, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*.
- 80 16. Utilización según la reivindicación 15, en la que dicho inmunoconjungado radiomarcado comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno seleccionado de entre el grupo constituido por CD19, CD20 o CD22.

ES 2 241 129 T5

17. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho medicamento comprende una combinación de por lo menos un anticuerpo anti-CD22 desnudo y un anticuerpo anti-CD19, una combinación de por lo menos un anticuerpo anti-CD22 desnudo y un anticuerpo anti-CD20.
- 5 18. Utilización según la reivindicación 17, en la que dicho anticuerpo anti-CD19 es un anticuerpo anti-CD19 desnudo.
19. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo anti-CD20 desnudo que no está conjugado con un agente terapéutico.
- 10 20. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho tratamiento quimioterapéutico consiste en la administración de por lo menos un fármaco seleccionado de entre el grupo constituido por ciclofosfamida, etopósido, vincristina, procarbazina, prednisona, carmustina, doxorrubicina, metotrexato, bleomicina, dexametasona, butirato de fenilo, briostatina-1 y leucovorina.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65