

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 953 441**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395	(2006.01)	A61K 45/06	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	A61K 31/337	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)	A61K 31/502	(2006.01)
A61K 31/357	(2006.01)	A61K 31/519	(2006.01)
A61P 35/02	(2006.01)	A61K 31/52	(2006.01)
A61P 35/04	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
C07K 16/28	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
A61K 47/68	(2007.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2016 PCT/US2016/038986**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16210108**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2016 E 16815285 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3313443**

(54) Título: **Combinación de anticuerpos anti-hla-dr o anti-Trop-2 con inhibidores de microtúbulos, inhibidores de parp, inhibidores de la cinasa de bruton o inhibidores de la fosfoinositida 3-cinasa mejora significativamente el resultado terapéutico en el cáncer**

(30) Prioridad:

25.06.2015 US 201562184331 P
05.08.2015 US 201562201361 P
04.11.2015 US 201562250715 P
04.12.2015 US 201562263134 P
14.03.2016 US 201615069208

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2023

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

GOLDENBERG, DAVID M. y
CARDILLO, THOMAS, M.

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 953 441 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

5 Combinación de anticuerpos anti-hla-dr o anti-Trop-2 con inhibidores de microtúbulos, inhibidores de parp, inhibidores de la cinasa de broton o inhibidores de la fosfoinositida 3-cinasa mejora significativamente el resultado terapéutico en el cáncer

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10 [0001] La presente invención se refiere a un inmunoconjungado que se une a Trop-2 para su uso en un método para tratar el cáncer que expresa Trop-2; y al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de PARP y un inhibidor de microtúbulos, para usar en un método para tratar el cáncer que expresa Trop-2. Dicha terapia de combinación es más eficaz que el inmunoconjungado solo, el fármaco solo o los efectos combinados del fármaco y el inmunoconjungado solos. Preferiblemente, la combinación presenta efectos sinérgicos. Preferiblemente, los inmunoconjungados se administran en dosis específicas y/o programas de administración específicos que optimizan su efecto terapéutico. Las dosis optimizadas y los programas de administración de conjungados de anticuerpo y fármaco (ADC) para uso terapéutico en humanos que se describen en el presente documento muestran una eficacia superior inesperada que no podría haberse predicho a partir de estudios en modelos animales, lo que permite un tratamiento eficaz de los cánceres que son resistentes a las terapias anticancerígenas estándar., incluido el irinotecán (CPT-11), el paclitaxel u otros compuestos que inducen roturas de la cadena de ADN. Sorprendentemente, la terapia de combinación con inmunoconjungados de anticuerpo-SN38 e inhibidores de microtúbulos o inhibidores de PARP muestra efectos sinérgicos inesperados. En una forma de realización particularmente preferida, un anticuerpo conjugado con SN-38 de uso es un anticuerpo anti-Trop-2, tal como IMMU-132 (sacituzumab govitecan, también conocido como hRS7-CL2A-SN-38 o IMMU-132). Más preferiblemente, los métodos son útiles en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer colorrectal metastásico, SCLC o NSCLC, así como otros cánceres que expresan Trop-2.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

30 [0002] Durante muchos años, el objetivo de los científicos en el campo de la terapia farmacológica específicamente dirigida ha sido utilizar anticuerpos monoclonales (MAbs) para la administración específica de agentes tóxicos a los cánceres humanos. Se han desarrollado conjungados de MAbs que se dirigen a antígenos asociados a tumores (TAA) y agentes tóxicos adecuados, pero han tenido un éxito mixto en la terapia del cáncer en humanos y prácticamente ninguna aplicación en otras enfermedades, como enfermedades infecciosas y autoinmunes. El agente tóxico suele ser un fármaco quimioterapéutico, aunque también se han conjugado radionúclidos emisores de partículas o toxinas bacterianas o vegetales con MAb, especialmente para el tratamiento del cáncer (Sharkey y Goldenberg, CA Cancer J Clin. 2006 Jul-Aug; 56(4):226-243) y, más recientemente, con radioinmunoconjungados para la terapia preclínica de ciertas enfermedades infecciosas (Dadachova y Casadevall, QJ Nucl Med Mol Imaging 2006;50(3): 193-204).

40 [0003] Las ventajas de usar conjungados de MAb-fármaco quimioterapéutico son que (a) el propio fármaco quimioterapéutico está estructuralmente bien definido; (b) el fármaco quimioterapéutico se une a la proteína MAb usando químicas de conjugación muy bien definidas, a menudo en sitios específicos alejados de las regiones de unión al antígeno de los MAb; (c) los conjungados de MAb-fármaco quimioterapéutico pueden fabricarse de manera más reproducible y, por lo general, con menos inmunogenicidad que los conjungados químicos que involucran MAb y toxinas bacterianas o vegetales y, como tales, son más susceptibles de desarrollo comercial y aprobación regulatoria; y (d) los conjungados MAb-fármaco quimioterapéutico son de orden de magnitud menos tóxicos desde el punto de vista sistémico que los conjungados de MAb con radionúclido, particularmente para la médula ósea sensible a la radiación.

50 [0004] La camptotecina (CPT) y sus derivados son una clase de potentes agentes antitumorales. El irinotecán (también denominado CPT-11) y el topotecán son análogos de CPT que son agentes terapéuticos contra el cáncer aprobados (Iyer y Ratain, Cancer Chemother. Pharmacol. 42: S31-S43 (1998)). Los CPT actúan inhibiendo la enzima topoisomerasa I al estabilizar el complejo topoisomerasa I-ADN (Liu, et al. en The Camptothecins: Unfolding Their Anticancer Potential, Liehr JG, Giovanella, BC and Verschraegen (eds), NY Acad Sci., NY 922:1 -10 (2000)). Los CPT presentan problemas específicos en la preparación de conjungados. Un problema es la insolubilidad de la mayoría de los derivados de CPT en tampones acuosos. En segundo lugar, los CPT brindan desafíos específicos para la modificación estructural para conjugar macromoléculas. Por ejemplo, el propio CPT contiene solo un grupo hidroxilo terciario en el anillo-E. El grupo funcional hidroxilo en el caso de CPT debe acoplarse a un enlazador adecuado para la posterior conjugación de proteínas; y en derivados CPT potentes, como SN-38, el metabolito activo del quimioterapéutico CPT-11, y otros derivados que contienen hidroxilo C-10, como topotecán y 10-hidroxi-CPT, la presencia de un hidroxilo fenólico en la posición C-10 complica la necesaria derivatización C-20-hidroxilo. En tercer lugar, la labilidad en condiciones fisiológicas del resto δ-lactona del anillo E de las camptotecinas da como resultado una potencia antitumoral muy reducida. Por lo tanto, el protocolo de conjugación se lleva a cabo a un pH de 7 o inferior para evitar la apertura del anillo de lactona. Sin embargo, la conjugación de un CPT bifuncional que posea un grupo reactivo con amina tal como un éster activo típicamente requeriría un pH de 8 o mayor. En cuarto lugar, preferiblemente

se incorpora un resto escindible intracelularmente en el enlazador/espaciador que conecta los CPT y los anticuerpos u otros restos de unión.

5 [0005] El documento WO 2015/047510 A1 está relacionado con conjugaciones anti-Trop-2 anticuerpo-fármaco y sus usos.

10 [0006] Existe la necesidad de métodos más efectivos para preparar y administrar conjugados de anticuerpo-fármaco, como conjugados de anticuerpo-SN-38, y una terapia de combinación más efectiva con anticuerpos o inmunoconjungados y fármacos, como inhibidores de microtúbulos, inhibidores de PARP, inhibidores de quinasa de Bruton o inhibidores de PI3K.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 [0007] El problema que subyace a la presente invención se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las formas de realización preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

20 [0008] Más específicamente, el problema que subyace a la presente invención se resuelve en un primer aspecto mediante un inmunoconjungado que se une a Trop-2 para su uso en un método para tratar el cáncer que expresa Trop-2, en el que el método comprende:

- 25 a) administrar a un sujeto humano con el cáncer el inmunoconjungado; y
- b) administrar al sujeto al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de PARP y un inhibidor de microtúbulos

en el que el inmunoconjungado comprende un anticuerpo anti-Trop-2 conjugado con SN-38.

30 [0009] Más específicamente, el problema que subyace a la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de PARP y un inhibidor de microtúbulos, para usar en un método para tratar el cáncer que expresa Trop-2, en el que el método comprende:

- 35 a) administrar a un sujeto humano con cáncer el inmunoconjungado; y
- b) administrar al sujeto al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de PARP y un inhibidor de microtúbulos, en el que el inmunoconjungado comprende un anticuerpo anti-Trop-2 conjugado con SN-38.

40 [0010] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, la combinación de anticuerpo o inmunoconjungado y agente terapéutico tiene un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento tumoral.

45 [0011] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, el anticuerpo anti-Trop-2 es hRS7.

50 [0012] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, el inhibidor de PARP se selecciona del grupo que consiste en olaparib, talazoparib (BMN-673), rucaparib, veliparib, CEP 9722, MK 4827, BGB-290, ABT-888, AG014699, BSI-201, CEP-8983 y 3-aminobenzamida; o el inhibidor de microtúbulos se selecciona del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un taxano, un maitansinoide, una auristatina, vincristina, vinblastina, paclitaxel, mertansina, demecolcina, nocodazol, epotilona, docetaxel, disodermolida, colchicina, combrestatina, podofilotoxina, CI-980, fenilahistinas, esteganacinas, curacinas, 2-metoxiestradiol, E7010, metoxibencenosulfonamidas, vinorelbina, vinflunina, vindesina, dolastatinas, espongistatina, rizoxina, tasidotina, halicondrinas, hemiasterlinas, criptoficina 52, MMAE y mesilato de eribulina.

55 [0013] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, el inhibidor de PARP es olaparib; o el inhibidor de microtúbulos es paclitaxel o mesilato de eribulina.

60 [0014] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, el cáncer es un tumor sólido y el tratamiento da como resultado una reducción del tamaño del tumor de al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 30 % o al menos un 40 %.

[0015] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, el cáncer es metastásico y el método comprende además reducir el tamaño o eliminar las metástasis.

[0016] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, el cáncer es refractario a otras terapias pero responde a la combinación de conjugado de anticuerpo-fármaco y agente terapéutico.

[0017] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, el paciente no ha respondido a la terapia con irinotecan, antes del tratamiento con el conjugado de anticuerpo-fármaco.

[0018] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, el método comprende además administrar al sujeto una o más modalidades terapéuticas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos no conjugados, anticuerpos radiomarcados, anticuerpos conjugados con fármacos, anticuerpos conjugados con toxinas, terapia génica, quimioterapia, péptidos terapéuticos, terapia con citocinas, oligonucleótidos, radioterapia localizada, cirugía y terapia con ARN de interferencia.

[0019] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, la modalidad terapéutica comprende el tratamiento con un agente seleccionado del grupo que consiste en 5-fluorouracilo, afatinib, aplidina, azaribina, anastrozol, antraciclinas, axitinib, AVL-101, AVL-291, bendamustina, bleomicina, bortezomib, bosutinib, briostatina-1, busulfán, caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, 10-hidroxicamptotecina, carmustina, celebrex, clorambucilo, cisplatino (CDDP), inhibidores de la Cox-2, irinotecán (CPT-11), SN-38, carboplatino, cladribina, camptotecanos, ciclofosfamida, crizotinib, citarabina, dacarbazina, dasatinib, dinaciclib, docetaxel, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina (2P-DOX), cianomorfolino doxorubicina, glucurónido de doxorubicina, glucurónido de epirubicina, erlotinib, estramustina, epidifilotoxina, erlotinib, entinostat, agentes de unión al receptor de estrógeno, etopósido (VP16), glucurónido de etopósido, fosfato de etopósido, exemestano, fingolimod, flavopiridol, floxuridina (FUDR), 3',5'-O-dioleoil-FUDR (FUDR-dO), fludarabina, flutamida, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, fostamatinib, ganetespib, GDC-0834, GS-1101, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, ibrutinib, idarrubicina, idelalisib, ifosfamida, imatinib, L-asparaginasa, lapatinib, lenolidamida, leucovorina, LFM- A13, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, Mitotano, Navelbina, Neratinib, Nilotinib, Nitrosurea, Olaaparib, Plicomicina, Procarbazina, Paclitaxel, PCI-32765, Postostatina, Psi-341, Raloxifeno, Semustineine, sorafenib, estreptozocina, SU11248, sunitinib, tamoxifeno, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecán, uracilo mostaza, vatalanib, vinorelbina, vinblastina, vincristina, alcaloides de la vinca y ZD1839.

[0020] En una forma de realización del primer y segundo aspecto, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer urotelial, cáncer de útero, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer renal, cáncer de próstata y cáncer colorrectal.

[0021] Preferiblemente, la terapia de combinación según la presente invención como se define en las reivindicaciones es más eficaz que el anticuerpo o el inmunoconjunto solos, el fármaco solo o la suma de los efectos del anticuerpo o inmunoconjunto y el fármaco. Lo más preferiblemente, la combinación exhibe efectos sinérgicos en sujetos humanos.

[0022] Como se usa en este documento, la abreviatura "CPT" puede referirse a camptotecina o cualquiera de sus derivados, como SN-38, a menos que se indique expresamente lo contrario. La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, proporciona métodos y composiciones mejorados para preparar y administrar inmunoconjuntos de anticuerpo CPT. Ejemplos de enfermedades o condiciones que pueden tratarse con los anticuerpos o inmunoconjuntos incluyen, por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune.

[0023] El anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones puede ser de varios tipos, preferiblemente IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, más preferiblemente comprende secuencias de región constante y bisagra de IgG1 humana. El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un humano-ratón químico, un humano-primate químico, un humanizado (estructura humana y regiones hipervariables murinas (CDR)), o un anticuerpo completamente humano, así como variaciones de los mismos, tales como anticuerpos IgG4. (denominados "anticuerpos"), como describen van der Neut Kolfschoten et al. (Ciencia 2007; 317:1554-1557). Más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo puede diseñarse o seleccionarse para que comprenda secuencias de regiones constantes humanas que pertenecen a alotipos específicos, lo que puede dar como resultado una inmunogenicidad reducida cuando el anticuerpo o inmunoconjunto se administra a un sujeto humano. Los alotipos preferidos para la administración incluyen un alotipo no G1m1 (nG1m1), 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.

[0024] Los anticuerpos de uso pueden unirse a cualquier antígeno asociado a una enfermedad conocido en la técnica. Cuando el estado de la enfermedad es cáncer, por ejemplo, se conocen en la técnica muchos antígenos expresados por o asociados con células tumorales, que incluyen, entre otros, anhidrasa carbónica IX, alfa-fetoproteína (AFP), α -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 α , antígeno p específico de colon (CSAp), CEA (CEACAM5), CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1

(Trop-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, GAGE, gp100, GRO-β, 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, la, IGF-1R, IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IFN-λ, 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 similar a la insulina-1 (IGF-1), IGF-1R, KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, inhibidor de la migración de macrófagos factor (MIF), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, mucina de cáncer de páncreas, receptor PD-1, receptor PD-L1, factor de crecimiento placentario, p53, PLAGL2, fosfatasa ácida prostática, PSA, PRAME, PSMA, P1GF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, S100, survivin, survivin-2B, TAC, TAG-72, tenascina, receptores TRAIL, TNF-α, 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 oncocárgeno y un producto oncocárgeno (véase, por ejemplo, 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 CEACAM5, CEACAM6, EGP-1 (Trop-2), MUC-16, AFP, MUC5a,c, CD74, CD19, CD20, CD22 o HLA-DR. Más preferiblemente, el anticuerpo se une a Trop-2 o HLA-DR.

[0025] Los ejemplos de anticuerpos que se pueden utilizar incluyen, entre otros, hR1 (anti-IGF-1R, solicitud de patente de EE. UU. número de serie 13/688,812, presentada el 29/11/12), hPAM4 (anti-mucina, patente de EE. UU. 7,282,567), hA20 (anti-CD20, patente de EE. UU. n.º 7, 151,164), hA19 (anti-CD19, patente de EE. UU. n.º 7,109,304), hIMMU31 (anti-AFP, patente de EE. UU. n.º Patente de EE. UU. n.º 7,312,318), hLL2 (anti-CD22, Patente de EE. UU. n.º 5,789,554), hMu-9 (anti-CSAp, Patente de EE. UU. n.º 7,387,772), hL243 (anti-HLA-DR, Patente de EE. UU. n.º 7,612,180), hMN-14 (anti-CEACAM5, patente de EE. UU. n.º 6.676.924), hMN-15 (anti-CEACAM6, patente de EE. UU. n.º 8.287.865), hRS7 (anti-EGP-1, patente de EE. UU. 7,238,785), hMN- 3 (anti-CEACAM6, patente de EE. UU. n.º 7.541.440), Ab124 y Ab125 (anti-CXCR4, patente de EE. UU. 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 usa en este documento, los términos epratuzumab y hLL2 son intercambiables, al igual que los términos veltuzumab y hA20, hL243g4P, hL243gamma4P e IMMU-114. En una forma de realización más preferida, el anticuerpo es un anticuerpo anti-Trop-2, como hRS7, o un anticuerpo anti-HLA-DR, como hL243.

[0026] Los anticuerpos alternativos de uso incluyen, entre otros, abciximab (anti-glucoproteína 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 PD-1), atezolizumab (anti-PD-L1), MEDI4736 (anti-PD-L1), nivolumab (anti-receptor PD-1), ipilimumab (anti-CTLA-4), abagovomab (anti-CA-125), adecatumumab (anti-EpCAM), atlizumab (anti-receptor de IL-6), benralizumab (anti-CD125), obinutuzumab (GA101, anti-CD20), CC49 (anti-TAG-72), AB-PG1-XG1-026 (anti-PSMA, solicitud de patente de EE. UU. 11/ 983,372, depositado como ATCC PTA-4405 y PTA-4406), D2/B (anti-PSMA, 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 CD3), natalizumab (anti-integrina α 4), omalizumab (anti-IgE); anticuerpos anti-TNF-α como CDP571 (Ofei et al., 2011, Diabetes 45:881-85), MTNFA1, M2TNFA1, M3TNFA1, M3TNFABI, M302B, M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL), infliximab (Centocor, Malvern, PA), certolizumab pegol (UCB, Bruselas, Bélgica), anti-CD40L (UCB, Bruselas, Bélgica), adalimumab (Abbott, Abbott Park, IL), Benlysta (Human Genome Sciences); anticuerpos para la terapia de la enfermedad de Alzheimer tales 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 como MOR03087 (MorphoSys AG), MOR202 (Celgene), HuMax-CD38 (Genmab) o daratumumab (Johnson & Johnson); (anticuerpos anti-VIH tales como P4/D10 (patente de EE. UU. 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 vendido por Polymun (Viena, Austria), también descrito en las patentes de EE. UU. 5.831.034, patente de EE. UU. 5.911.989 y Vcelar et al., AIDS 2007; 21(16):2161-2170 y Joos et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2006 50(5):1773-9.

[0027] De acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones, un resto de fármaco conjugado con un anticuerpo se selecciona de camptotecina (CPT) y sus análogos y derivados y es más preferiblemente SN-38. Sin embargo, otras fracciones de fármacos que pueden utilizarse incluyen taxanos (p. ej., bacatina III, taxol), auristatinas (p. ej., MMAE), caliqueamicinas, epotilonas, antraciclinas (p. ej., doxorrubicina (DOX), epirubicina, morfolinodoxorrubicina (morfolino-DOX), cianomorfolinodoxorrubicina (cianomorfólico-DOX), 2-pirrolinodoxorrubicina (2-PDOX), una forma de profármaco de 2-PDOX (pro-2-PDOX), topotecán, etopósido, cisplatino, oxaliplatino o carboplatino; véase, por ejemplo, Priebe W (ed.), serie de simposios ACS 574, publicado por American Chemical Society, Washington DC, 1995 (332 páginas) y Nagy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 93:2464-2469, 1996). Como alternativa, el fármaco puede ser un inhibidor de la cinasa de Bruton, como ibrutinib (PCI-32765), PCI-45292, CC-292 (AVL-292), ONO-4059, GDC-0834, LFM-A13 o RN486, o un PI3K inhibidor, como idelalisib, Wortmannin, demethoxyviridin, perifosine, PX-866, IPI-145 (duvelisib), BAY 80-6946, BEZ235, RP6530, TGR1202, SF1126, INK1117, GDC-0941, BKM120, XL147, XL765, Palomid 529, GSK1059615, ZSTK474, PWT33597, IC87114, TG100-115, CAL263, PI-103, GNE477, CUDC-907, AEZS-136 o LY294002. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del

5 mismo se une a al menos un resto quimioterapéutico; preferiblemente de 1 a aproximadamente 5 restos de fármaco; más preferiblemente de 6 a 8 fracciones de fármaco, lo más preferiblemente de aproximadamente 6 a 10 aproximadamente 12 fracciones de fármaco.

10 **[0028]** Un ejemplo de un derivado de CPT soluble en agua es CPT-11. Hay disponible una gran cantidad de datos clínicos sobre la farmacología de CPT-11 y su conversión in vivo en el SN-38 activo (Iyer y Ratain, Cancer Chemother Pharmacol. 42:S31-43 (1998); Mathijssen et al., Clin Cancer Res. 7: 2182-2194 (2002); Rivory, Ann NY Acad Sci. 922:205-215, 2000)). La forma activa SN-38 es aproximadamente 2 a 3 órdenes de magnitud más potente que CPT-11. En formas de realización preferidas específicas, el inmunoconjungado puede ser un hMN-14-SN-38, hMN-3-SN-38, hMN- Conjugado 15-SN-38, IMMU-31-SN-38, hRS7- SN-38, hA20-SN-38, hL243-SN-38, hLL1-SN-38 o hLL2-SN-38.

15 **[0029]** De acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones, el cáncer incluye, entre otros, linfomas no Hodgkin, leucemias linfoides crónicas y agudas de células B, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma agudo de células B grandes, leucemia de células pilosas, leucemia mieloide aguda leucemia, 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 huesos y piel. Los carcinomas pueden incluir carcinomas de la cavidad oral, esófago, tracto gastrointestinal, tracto pulmonar, pulmón, estómago, colon, recto, mama, ovario, próstata, útero, endometrio, cuello uterino, vejiga urinaria, páncreas, hueso, cerebro, tejido conectivo, tiroides, hígado, vesícula biliar, vejiga urinaria (urotelial), riñón, piel, sistema nervioso central y testículos.

20 **[0030]** En ciertas formas de realización de la presente invención como se define en las reivindicaciones, el inmunoconjungado puede usarse en combinación con cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia con anticuerpos desnudos, incluidos anticuerpos inhibidores de puntos de control, radioinmunoterapia, inmunomoduladores, vacunas y similares. Estas terapias de combinación pueden permitir que se administren dosis más bajas de cada agente terapéutico en dichas combinaciones, reduciendo así ciertos efectos secundarios graves y reduciendo potencialmente los ciclos de terapia necesarios. Cuando la toxicidad superpuesta es nula o mínima, también se pueden administrar dosis completas de cada uno.

25 **[0031]** La dosificación óptima preferida de inmunoconjungados puede incluir una dosificación de entre 1 mg/kg y 20 mg/kg, más preferiblemente de 4 a 16 mg/kg, más preferiblemente de 8 a 10 mg/kg, preferiblemente administrada semanalmente, dos veces por semana, cada dos semanas., o cada tercera semana. El programa de dosificación óptimo puede incluir ciclos de tratamiento de dos semanas consecutivas de terapia seguido de una, dos, tres o cuatro semanas de descanso, o alternando semanas 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, una vez cada tres semanas o una vez al mes. El tratamiento puede extenderse por 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. Las dosis de uso ejemplares pueden incluir 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 y 18 mg/kg. La persona con conocimientos ordinarios se dará cuenta de que una variedad de factores, como la edad, la salud general, la función o el peso de órganos específicos, así como los efectos de la terapia previa en sistemas de órganos específicos (p. ej., médula ósea) se pueden considerar para seleccionar un tratamiento óptimo. dosis de inmunoconjungado, y que la dosis y/o la frecuencia de administración pueden aumentar o disminuir durante el curso de la terapia. La dosis puede repetirse según sea necesario, y se observa evidencia de reducción del tumor después de tan solo 4 a 8 dosis. Las dosis optimizadas y los programas de administración descritos en este documento muestran una eficacia superior inesperada y una toxicidad reducida en sujetos humanos, lo que no podría haberse previsto a partir de estudios en modelos animales. Sorprendentemente, la eficacia superior permite el tratamiento de tumores que previamente se encontró que eran resistentes a una o más terapias anticancerígenas estándar, incluido el compuesto original, CPT-11, del cual se deriva in vivo SN-38.

30 **[0032]** La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, puede incluir el uso de CT y/o PET/CT, o MRI, para medir la respuesta del tumor a intervalos regulares. También se pueden controlar los niveles en sangre de marcadores tumorales, como CEA (antígeno carcinoembrionario), CA19-9, AFP, CA 15.3 o PSA. Las dosis y/o los programas de administración se pueden ajustar según sea necesario, de acuerdo con los resultados de las imágenes y/o los niveles sanguíneos de los marcadores.

35 **[0033]** Un resultado sorprendente con la presente invención como se define en las reivindicaciones es la tolerabilidad inesperada de altas dosis de conjugado de anticuerpo-fármaco cuando se administran a pacientes, incluso con infusiones repetidas, observándose solo toxicidades de grado relativamente bajo de náuseas y vómitos, o neutropenia manejable. Preferiblemente, la incidencia de efectos secundarios de grado 3 o superior, tales como anemia, diarrea, náuseas, vómitos o neutropenia, se limita al 26% o menos de la población tratada. Más preferiblemente, la incidencia de diarrea y neutropenia de grado 3 o superior se produce en el 26% o menos de la población tratada. Otro resultado sorprendente es la falta de acumulación del conjugado anticuerpo-fármaco, a diferencia de otros productos que han

conjugado SN-38 con albúmina, PEG u otros transportadores, en tejidos no objetivo o tejidos objetivo donde el MAb no es accesible. La falta de acumulación se asocia con una mejor tolerabilidad y ausencia de toxicidad grave incluso después de dosis repetidas o aumentadas. Estos resultados sorprendentes permiten la optimización de la dosificación y el programa de administración, con eficacias inesperadamente altas y toxicidades bajas; es decir, un índice terapéutico más alto que cuando el fármaco original de SN-38, el irinotecán, se administra solo o en combinación con otros fármacos. Esto está subrayado por la advertencia de recuadro negro en la etiqueta del producto de irinotecán, requerida por la FDA, que indica la diarrea temprana y tardía altamente severa que resulta de la terapia con irinotecán. Esto no se experimenta en la misma medida y frecuencia con estos ADC que contienen SN-38. Incluso la neutropenia febril es mucho menor con los SN-38-ADC descritos en este documento que con la terapia con irinotecán.

[0034] La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, prevé la reducción de tumores sólidos, en individuos con cánceres previamente resistentes, del 15 % o más, preferentemente del 20 % o más, preferentemente del 30 % o más, más preferentemente del 40 % o más de tamaño (como medido sumando el diámetro más largo de las lesiones diana, según RECIST o RECIST 1.1). El experto en la materia se dará cuenta de que el tamaño del tumor se puede medir mediante una variedad de técnicas diferentes, como el volumen total del tumor, el tamaño máximo del tumor en cualquier dimensión o una combinación de medidas de tamaño en varias dimensiones. Esto puede ser con procedimientos radiológicos estándar, como tomografía computarizada, imágenes por resonancia magnética, ultrasonografía y/o tomografía por emisión de positrones. Los medios para medir el tamaño son menos importantes que observar una tendencia de disminución del tamaño del tumor con el tratamiento con anticuerpos o inmunoconjungados, que preferiblemente da como resultado la eliminación del tumor. Sin embargo, para cumplir con las pautas RECIST, se prefiere la TC o la RM en serie y se deben repetir para confirmar las mediciones.

[0035] Mientras que el anticuerpo o inmunoconjungado puede administrarse como una inyección de bolo periódica, en formas de realización alternativas de la invención como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo o inmunoconjungado puede administrarse mediante infusión continua. Para aumentar la Cmax y extender la PK del anticuerpo o inmunoconjungado en la sangre, se puede administrar una infusión continua, por ejemplo, mediante un catéter permanente. Dichos dispositivos son conocidos en la técnica, como los catéteres HICKMAN®, BROVIAC® o PORT-A-CATH® (ver, por ejemplo, Skolnik et al., Ther Drug Monit 32:741-48, 2010) y cualquier catéter permanente conocido. puede ser usado. También se conocen en la técnica una variedad de bombas de infusión continua y se puede usar cualquier bomba de infusión conocida. El rango de dosificación para infusión continua puede estar entre 0,1 y 3,0 mg/kg por día. Más preferiblemente, estos inmunoconjungados pueden administrarse mediante infusions intravenosas durante períodos relativamente cortos de 2 a 5 horas, más preferiblemente de 2 a 3 horas.

[0036] En formas de realización particularmente preferidas de la presente invención como se define en las reivindicaciones, los anticuerpos o inmunoconjungados y los programas de dosificación pueden ser eficaces en pacientes resistentes a las terapias estándar. Por ejemplo, se puede administrar un inmunoconjungado hRS7-SN-38 a un paciente que no ha respondido a una terapia previa con irinotecan, el agente original de SN-38. Sorprendentemente, el paciente resistente al irinotecán puede mostrar una respuesta parcial o incluso completa a hRS7-SN-38. La capacidad del inmunoconjungado para dirigirse específicamente al tejido tumoral puede superar la resistencia tumoral mediante una orientación mejorada y una administración mejorada del agente terapéutico. Un sujeto preferido específico puede ser un paciente con Trop-2 positivo de mama, ovario, cuello uterino, endometrio, pulmón, próstata, colon, recto, estómago, esófago, vejiga (urotelial), riñón, páncreas, cerebro, tiroides, epitelio o cáncer de cabeza y cuello. Preferiblemente, el cáncer es un cáncer metastásico. Más preferiblemente, el paciente ha fracasado previamente en el tratamiento con al menos una terapia estándar contra el cáncer. Lo más preferiblemente, el paciente ha fracasado previamente en la terapia con irinotecan (CPT-11), el compuesto original de SN-38. En formas de realización preferidas alternativas, el cáncer es TNBC, no TNBC, cáncer de endometrio, pulmón u ovario.

[0037] En ciertas formas de realización preferidas de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, se puede usar un inmunoconjungado, como sacituzumab govitecan, en terapia de combinación con al menos un inhibidor de microtúbulos. Se conocen en la técnica varios inhibidores de microtúbulos, tales como alcaloides de la vinca (p. ej., vincristina, vinblastina), taxanos (p. ej., paclitaxel), maitansinoides (p. ej., mertansina) y auristatinas. Otros inhibidores de microtúbulos conocidos incluyen demecolcina, nocodazol, epotilona, docetaxel, discodermolida, colchicina, combrestatina, podofilotoxina, CI-980, fenilahistinas, esteganacinas, curacinas, 2-metoxiestradiol, E7010, metoxibencenosuflonamidas, vinorelbina, vinflunina, vindesina, dolastatinas, spongistatina, rizoxina, tasidotina, halicondrinas, hemiasterlinas, criptoficina 52, MMAE y mesilato de eribulina (véase, por ejemplo, Dumontet & Jordan, 2010, Nat Rev Drug Discov 9:790-803). Cualquier inhibidor de microtúbulos conocido puede usarse en combinación con un anticuerpo o un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). Preferiblemente, el inhibidor de microtúbulos es uno que exhibe efectos sinérgicos cuando se usa en combinación con un anticuerpo o ADC. Un ejemplo potente es el anticuerpo conjugado con SN-38, como sacituzumab govitecan o labetuzumab govitecan (dirigido a CEACAMS) expresado por muchos cánceres sólidos. Lo más preferiblemente, el inhibidor de microtúbulos es paclitaxel o mesilato de eribulina.

[0038] En otras formas de realización preferidas de la presente invención como se define en las reivindicaciones, el ADC se puede usar en terapia de combinación con al menos un inhibidor de PARP. Uno de estos ADC está compuesto por SN-38 conjugado con un anticuerpo dirigido a tumores, como sacituzumab govitecan o labetuzumab govitecan.

Se conocen en la técnica varios inhibidores de PARP, como olaparib, talazoparib (BMN-673), rucaparib, veliparib, niraparib, iniparib, CEP 9722, MK 4827, BGB-290, ABT-888, AG014699, BSI-201, CEP-8983 y 3-aminobenzamida (ver, por ejemplo, Rouleau et al., 2010, Nat Rev Cancer 10:293-301, Bao et al., 2015, Oncotarget [Epub antes de la impresión, 22 de septiembre de 2015]). Cualquier inhibidor de PARP conocido puede usarse en combinación con un anticuerpo o ADC, tal como, por ejemplo, un conjugado de anticuerpo SN-38 o un conjugado de anticuerpo P2PDox. Preferiblemente, el inhibidor de PARP es uno que exhibe efectos sinérgicos cuando se usa en combinación con el anticuerpo o ADC. Esto se ha validado al usar un anticuerpo conjugado con SN-38, como sacituzumab govitecan. Lo más preferiblemente, el inhibidor de PARP es olaparib o rucaparib.

- 5 [0039] De acuerdo con la presente descripción, se puede usar un anticuerpo o inmunoconjulado en combinación con un inhibidor de quinasa de Bruton o un inhibidor de PI3K. Los inhibidores de la quinasa Bruton ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ibrutinib (PCI-32765), PCI-45292, CC-292 (AVL-292), ONO-4059, GDC-0834, LFM-A13 o RN486. Los inhibidores de PI3K ejemplares incluyen, entre otros, idelalisib, Wortmannin, demetoxiviridina, perifosina, PX-866, IPI-145 (duvelisib), BAY 80-6946, BEZ235, RP6530, TGR1202, SF1126, INK1117, GDC-0941, BKM120, XL147, 15 XL765, Palomid 529, GSK1059615, ZSTK474, PWT33597, IC87114, TG100-115, CAL263, PI-103, GNE477, CUDC-907, AEZS-136 o LY294002. Cualquier inhibidor de quinasa Bruton o PI3K conocido en la técnica se puede utilizar en la terapia de combinación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 20 [0040]
- 25 **FIG. 1A. Sinergia de IMMU-132 más Olaparib en BRCA1/2 w.t. TNBC (MDA-MB-468).** Las curvas de dosis/respuesta para cada agente solo se probaron primero para determinar los valores Cl_{10} , Cl_{20} o Cl_{30} del agente único después de una incubación de 96 horas. En ensayos combinados, se probó un agente (p. ej., IMMU-132) en una línea celular dada en un rango de concentraciones (es decir, curvas de dosis/respuesta). Un conjunto de pozos solo recibió IMMU-132. Otro conjunto recibió IMMU-132 como dosis/respuesta con una cantidad constante de olaparib (p. ej., Cl_{10} -concentración). Otros dos conjuntos utilizaron olaparib en concentraciones Cl_{20} o Cl_{30} . Para cada curva de dosis/respuesta de IMMU-132, se determinó el valor Cl_{50} a partir de estos datos. FIG. 1A muestra los cambios en los valores de Cl_{50} de olaparib cuando se combina con cantidades constantes de IMMU-132 (0,6, 1,1 o 1,8 nM de equivalentes de SN-38).
- 30 **FIG. 1B. Sinergia de IMMU-132 más Olaparib en BRCA1/2 w.t. TNBC (MDA-MB-468).** Las curvas de dosis/respuesta para cada agente solo se probaron primero para determinar los valores Cl_{10} , Cl_{20} o Cl_{30} del agente único después de una incubación de 96 horas. En ensayos combinados, se probó un agente (p. ej., IMMU-132) en una línea celular dada en un rango de concentraciones (es decir, curvas de dosis/respuesta). Un conjunto de pozos solo recibió IMMU-132. Otro conjunto recibió IMMU-132 como dosis/respuesta con una cantidad constante de olaparib (p. ej., Cl_{10} -concentración). Otros dos conjuntos utilizaron olaparib en concentraciones Cl_{20} o Cl_{30} . Para cada curva de dosis/respuesta de IMMU-132, se determinó el valor Cl_{50} a partir de estos datos. FIG. 1B muestra la misma línea celular que muestra cambios en los valores de IMMU-132 Cl_{50} cuando se combina con cantidades constantes de olaparib (1, 2 o 3 mM).
- 35 **FIG. 1C. Sinergia de IMMU-132 más Olaparib en BRCA1/2 w.t. TNBC (MDA-MB-468).** Las curvas de dosis/respuesta para cada agente solo se probaron primero para determinar los valores Cl_{10} , Cl_{20} o Cl_{30} del agente único después de una incubación de 96 horas. En ensayos de combinación, se probó un agente (p. ej., IMMU-132) en una línea celular determinada en un rango de concentraciones (es decir, curvas de dosis/respuesta). Un conjunto de pozos solo recibió IMMU-132. Otro conjunto recibió IMMU-132 como dosis/respuesta con una cantidad constante de olaparib (p. ej., Cl_{10} -concentración). Otros dos conjuntos utilizaron olaparib en concentraciones Cl_{20} o Cl_{30} . Para cada curva de dosis/respuesta de IMMU-132, se determinó el valor Cl_{50} a partir de estos datos. FIG. 1C muestra un isobolograma de valores Cl_{50} normalizados de tres experimentos separados que prueban la interacción de IMMU-132 y olaparib, mostrando claramente una interacción sinérgica.
- 40 **FIG. 2A. Inhibición del crecimiento tumoral de IMMU-132 y Olaparib combinados en TNBC: tumores defectuosos para BRCA1/2 y PTEN.** Los ratones con tumor ($TV \sim 0,3 \text{ cm}^3$) se trataron con olaparib (1 mg; $\sim 50 \text{ mg/kg}$, i.p. en un programa MF; flechas rojas) o IMMU-132 (iv semanalmente, flechas negras). Se usó como control un anti-CD20 SN-38-ADC no dirigido a tumores. HCC1806 es una línea tumoral TNBC defectuosa en BRCA1/2. Olaparib solo tuvo efectos antitumorales significativos. IMMU-132 solo inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con todos los grupos de control ($P < 0,0106$, AUC). IMMU-132 más olaparib mejoraron aún más las respuestas antitumorales significativamente en comparación con todos los grupos ($P < 0,0019$; AUC). Los ratones del grupo de combinación aún no han alcanzado la supervivencia media ($> 80,5$ días), que es más de 2 y 4 veces más larga que la monoterapia con IMMU-132 o olaparib, respectivamente ($P < 0,0083$).
- 45 **FIG. 2B. Inhibición del crecimiento tumoral de IMMU-132 y Olaparib combinados en TNBC: tumores defectuosos para BRCA1/2 y PTEN.** Los ratones portadores de tumores ($TV \sim 0,3 \text{ cm}^3$) se trataron con olaparib (1 mg; $\sim 50 \text{ mg/kg}$, i.p. en un programa de MF; flechas claras) o IMMU-132 (iv semanalmente, flechas oscuras). Se usó como control un anti-CD20 SN-38-ADC no dirigido a tumores. En los tumores *BRCA1/2 wt*, MDA-MB-468 defectuosos para PTEN, IMMU-132 solo tuvo efectos antitumorales significativos en

comparación con todos los grupos de control ($P < 0,0098$; AUC). Sin embargo, la combinación de IMMU-132 más olaparib inhibió el crecimiento tumoral significativamente mejor que IMMU-132 u olaparib solo ($P = 0,004$; AUC). Esto se traduce en un beneficio de supervivencia significativo en comparación con todos los demás grupos ($P < 0,045$).

FIG. 3A. Inhibición del crecimiento tumoral de IMMU-132 combinado e inhibidores de microtúbulos en xenoinjertos tumorales TNBC humanos. Los ratones portadores de tumores ($TV \sim 0,3 \text{ cm}^3$) se trataron con paclitaxel o mesilato de eribulina, como se indica, solos o con IMMU-132. La terapia se administró como inyecciones semanales durante dos semanas con una semana de descanso antes de repetir. Se usó un ADC anti-CD20 SN-38-ADC no dirigido a tumores como ADC de control. Los ratones portadores de tumores HCC1806 tratados con la combinación de IMMU-132 más paclitaxel inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con IMMU-132 solo ($P < 0,0195$, AUC).

FIG. 3B. Inhibición del crecimiento tumoral de IMMU-132 combinado e inhibidores de microtúbulos en xenoinjertos tumorales TNBC humanos. Los ratones portadores de tumores ($TV \sim 0,3 \text{ cm}^3$) se trataron con paclitaxel o mesilato de eribulina, como se indica, solos o con IMMU-132. La terapia se administró como inyecciones semanales durante dos semanas con una semana de descanso antes de repetir. Se usó un ADC anti-CD20 SN-38-ADC no dirigido a tumores como ADC de control. Los ratones portadores de tumores HCC1806 tratados con la combinación de IMMU-132 más paclitaxel mostraron un beneficio de supervivencia significativo en comparación con todos los demás tratamientos ($P < 0,006$, rango logarítmico).

FIG. 3C. Inhibición del crecimiento tumoral de IMMU-132 combinado e inhibidores de microtúbulos en xenoinjertos tumorales TNBC humanos. Los ratones con tumores MDA-MB-468 demostraron efectos antitumorales significativos cuando se combinó IMMU-132 (100 o 200 mg) con paclitaxel en comparación con los ratones que recibieron monoterapia ($P < 0,0328$, AUC).

FIG. 3D. Inhibición del crecimiento tumoral de IMMU-132 combinado e inhibidores de microtúbulos en xenoinjertos tumorales TNBC humanos. El mesilato de eribulina solo inhibe significativamente el crecimiento del tumor MDA-MB-468 ($P = 0,0019$, AUC). Es importante destacar que la combinación de IMMU-132 más mesilato de eribulina resultó en regresiones tumorales significativas con volúmenes tumorales medios que retrocedieron a $0,026 \pm 0,033 \text{ cm}^3$ versus $0,177 \pm 0,087 \text{ cm}^3$ y $0,344 \pm 0,302 \text{ cm}^3$ para los grupos de IMMU-132 y monoterapia con eribulina, respectivamente ($P < 0,0009$ combinado frente a todos los demás grupos de terapia, AUC).

FIG. 3E. Inhibición del crecimiento tumoral de IMMU-132 combinado e inhibidores de microtúbulos en xenoinjertos tumorales TNBC humanos. IMMU-132 más mesilato de eribulina produjo efectos antitumorales significativos en comparación con todos los demás grupos de tratamiento ($P < 0,0432$; prueba t pareada de dos colas).

FIG. 3F. Inhibición del crecimiento tumoral de IMMU-132 combinado e inhibidores de microtúbulos en xenoinjertos tumorales TNBC humanos. IMMU-132 más mesilato de eribulina proporcionó un beneficio de supervivencia significativo en comparación con todos los grupos, excepto la combinación de mesilato de eribulina más ADC de control ($P < 0,0284$).

FIG. 4. Actividad sinérgica de IMMU-132 más Olaparib en varias líneas celulares de TNBC humano. Se muestra un resumen de los valores del índice de combinación (CI) calculados para varias líneas celulares. Los números de CI se calculan usando la siguiente fórmula: $CI = Da/Dxa + Db/Dxb$, donde

$Da = CI_{50}$ -dosis de IMMU-132 cuando se usa en combinación con una cantidad constante de Olaparib
 $Db = CI_{50}$ -dosis de Olaparib cuando se usa en combinación con una cantidad constante de IMMU-132

$Dxa = CI_{50}$ -dosis de IMMU-132 cuando se usa solo

$Dxb = CI_{50}$ -dosis de Olaparib cuando se usa solo

^aIMMU-132 valor de CI_{50} (nM) cuando se combina con olaparib.

^bOlaparib valor de CI_{50} (nM) cuando se combina con IMMU-132.

^cNúmero de índice de combinación de IC (IC<1,0 es indicativo de sinergia).

FIG. 5A. Efecto de IMMU-114 sobre CI_{50} de ibrutinib.

FIG. 5B. Efecto de IMMU-114 sobre CI_{50} de idelalisib.

FIG. 6A. Isobolograma que demuestra un efecto aditivo de IMMU-114 combinado con un inhibidor de la quinasa de Bruton (ibrutinib) en una línea celular de LLC humana. Se incubaron células de leucemia de células B crónicas humanas (JVM-3) en placas de 96 pocillos con un inhibidor de la cinasa de Bruton (ibrutinib) en dosis que oscilaban entre 1×10^{-5} y $3,9 \times 10^{-9}$ M. Un conjunto de células recibió solo el inhibidor mientras que otros conjuntos recibieron el inhibidor más una cantidad constante de IMMU-114 (0,25, 0,5, 0,75 o 1 nM). Las placas se incubaron durante 96 h. La viabilidad celular se evaluó mediante ensayo MTS y se generaron curvas de dosis/respuesta para cada condición. Los valores de CI_{50} se determinaron usando Prism GraphPad. Los datos se normalizaron y se generó un isobolograma, lo que indica un efecto aditivo para ibrutinib cuando se combina con IMMU-114 **FIG. 6B.** Isobolograma que demuestra un efecto aditivo de IMMU-114 combinado con un inhibidor de PI3K (idelalisib) en una línea celular de LLC humana. Los estudios se realizaron como se describe en la leyenda de la **FIG. 6A**. El isobolograma indicó un efecto aditivo para idelalisib cuando se combina con IMMU-114.

FIG. 7. Terapia *in vivo* de ratones desnudos atípicos, portadores de carcinoma pancreático humano Capan 1, con conjugados MAb-CL2A-SN-38.

FIG. 8. Terapia *in vivo* de ratones desnudos atípicos, portadores de carcinoma pancreático humano BxPC3, con conjugados MAb-CL2A-SN-38.

FIG. 9. Terapia *in vivo* de ratones desnudos atípicos, portadores de carcinoma de colon humano LS174T, con conjugado hMN-14-CL2A-SN-38.

FIG. 10. Curvas de supervivencia de ratones tratados con hMN14-CL-**SN-38** que portan enfermedad metastásica pulmonar GW-39.

FIG. 11A. Eficacia terapéutica del ADC hRS7-SN-38 en ratones portadores de xenoinjertos de tumor de pulmón de células no pequeñas humanas. Se inyectaron ratones con tumores Calu-3 ($N = 5-7$) con hRS7-CL2-SN-38 cada 4 días para un total de 4 inyecciones (q4dx4). Todos los ADC y controles se administraron en las cantidades indicadas (expresadas como cantidad de SN-38 por dosis; flechas largas = inyecciones de conjugado, flechas cortas = inyecciones de irinotecán).

FIG. 11B. Eficacia terapéutica del ADC hRS7-SN-38 en ratones portadores de xenoinjertos de tumor colorrectal humano. A ratones COLO 205 portadores de tumores 5) se les inyectó 8 veces (q4dx8) el ADC o cada 2 días para un total de 5 inyecciones (q2dx5) con el MTD de irinotecán. Todos los ADC y controles se administraron en las cantidades indicadas (expresadas como cantidad de SN-38 por dosis; flechas largas = inyecciones de conjugado, flechas cortas = inyecciones de irinotecán).

FIG. 11C. Eficacia terapéutica de hRS7-SN-38 ADC en ratones portadores de xenoinjertos de cáncer de páncreas humano. Se trataron ratones con tumor Capan-1 ($N = 10$) ($N = 10$) dos veces por semana durante 4 semanas con los agentes indicados. Todos los ADC y controles se administraron en las cantidades indicadas (expresadas como cantidad de SN-38 por dosis; flechas largas = inyecciones de conjugado, flechas cortas = inyecciones de irinotecán).

FIG. 11D. Eficacia terapéutica de hRS7-SN-38 ADC en ratones portadores de xenoinjertos de cáncer de páncreas humano. Se trataron ratones portadores de tumores BxPC-3 ($N = 10$) dos veces por semana durante 4 semanas con los agentes indicados. Todos los ADC y controles se administraron en las cantidades indicadas (expresadas como cantidad de SN-38 por dosis; flechas largas = inyecciones de conjugado, flechas cortas = inyecciones de irinotecán).

FIG. 11E. Eficacia terapéutica de hRS7-SN-38 ADC en ratones portadores de xenoinjertos de carcinoma de pulmón de células escamosas humanas. Además del ADC administrado dos veces por semana durante 4 semanas, los ratones portadores de tumores SK-MES-1 ($N = 8$) recibieron la MTD de CPT-11 (q2dx5). Todos los ADC y controles se administraron en las cantidades indicadas (expresadas como cantidad de SN-38 por dosis; flechas largas = inyecciones de conjugado, flechas cortas = inyecciones de irinotecán).

FIG. 12A. Eficacia comparativa de los conjugados epratuzumab (Emab)-SN-38 y veltuzumab (Vmab)-SN-38 en el modelo de Ramos subcutáneo. A ratones desnudos ($N = 10$ por grupo) con tumores que promediaban aproximadamente $0,35 \text{ cm}^3$ ($0,20-0,55 \text{ cm}^3$) se les administró $0,25 \text{ mg}$ de Emab-SN-38 dos veces por semana durante 4 semanas.

FIG. 12B. Eficacia comparativa de los conjugados epratuzumab (Emab)-SN-38 y veltuzumab (Vmab)-SN-38 en el modelo de Ramos subcutáneo. A ratones desnudos ($N = 10$ por grupo) con tumores que promediaban aproximadamente $0,35 \text{ cm}^3$ ($0,20-0,55 \text{ cm}^3$) se les administró $0,25 \text{ mg}$ de Vmab-SN-38 dos veces por semana durante 4 semanas.

FIG. 12C. Eficacia comparativa de los conjugados epratuzumab (Emab)-SN-38 y veltuzumab (Vmab)-SN-38 en el modelo de Ramos subcutáneo. A ratones desnudos ($N = 10$ por grupo) con tumores que promediaban aproximadamente $0,35 \text{ cm}^3$ ($0,20-0,55 \text{ cm}^3$) se les administró $0,5 \text{ mg}$ de Emab-SN-38 dos veces por semana durante 4 semanas.

FIG. 12D. Eficacia comparativa de los conjugados epratuzumab (Emab)-SN-38 y veltuzumab (Vmab)-SN-38 en el modelo de Ramos subcutáneo. A ratones desnudos ($N = 10$ por grupo) con tumores que promediaban aproximadamente $0,35 \text{ cm}^3$ ($0,20-0,55 \text{ cm}^3$) se les administró $0,5 \text{ mg}$ de Vmab-SN-38 dos veces por semana durante 4 semanas.

FIG. 13A. Especificidad del conjugado anti-CD22-SN-38 de Emab (línea continua) frente a un conjugado irrelevante de labetuzumab (Lmab)-SN-38 (línea discontinua) en ratones desnudos con tumores de Ramos subcutáneos. A los animales se les administraron dosis dos veces por semana de 75 \mu g de cada conjugado por dosis ($54,5 \text{ mg/kg}$ de SN-38, basado en un peso promedio de 22 g) por vía intraperitoneal durante 4 semanas. Supervivencia basada en el tiempo hasta la progresión (TTP) a $3,0 \text{ cm}^3$, con tumores que comienzan en 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. C, curvas de supervivencia (gris sólido) para otro grupo de animales que recibieron inyecciones intraperitoneales semanales de irinotecán ($6,5 \text{ \mu g/dosis}$; equivalentes de SN-38 aproximadamente iguales a la dosis de 250 \mu g del conjugado Emab-SN-38).

FIG. 13B. Especificidad del conjugado anti-CD22-SN-38 de Emab (línea continua) frente a un conjugado irrelevante de labetuzumab (Lmab)-SN-38 (línea discontinua) en ratones desnudos con tumores de Ramos subcutáneos. A los animales se les administraron dosis dos veces por semana de 125 \mu g de cada conjugado por dosis (91 mg/kg de SN-38, basado en un peso promedio de 22 g) por vía intraperitoneal durante 4 semanas. Supervivencia basada en el tiempo hasta la progresión (TTP) a $3,0 \text{ cm}^3$, con tumores que comienzan en 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. C, curvas de supervivencia (gris sólido) para otro grupo de animales que recibieron inyecciones intraperitoneales

semanales de irinotecán (6,5 µg/dosis; equivalentes de SN-38 aproximadamente iguales a la dosis de 250 µg del conjugado Emab-SN-38).

FIG. 13C. Especificidad del conjugado anti-CD22-SN-38 de Emab (línea continua) frente a un conjugado irrelevante de labetuzumab (Lmab)-SN-38 (línea discontinua) en ratones desnudos con tumores de Ramos subcutáneos. A los animales se les administraron dosis dos veces por semana de 250 mg de cada conjugado por dosis (182 mg/kg de SN-38, basado en un peso promedio de 22 g) por vía intraperitoneal durante 4 semanas. Supervivencia basada en el tiempo hasta la progresión (TTP) a 3,0 cm³, con tumores que comienzan en un tamaño promedio de 0,4 cm³. 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 (gris sólido) para otro grupo de animales que recibieron inyecciones intraperitoneales semanales de irinotecán (6,5 µg/dosis; equivalentes de SN-38 aproximadamente igual a la dosis de 250 µg del conjugado Emab-SN-38).

FIG. 14. Antecedentes de tratamiento previo del paciente, antes de administrar IMMU-130 (labetuzumab-SN-38). El tratamiento previo incluyó colectomía/hepatectomía (lóbulo parcial) por CCR en estadio IV, terapia de ablación por radiofrecuencia de metástasis hepáticas, resección en cuña de metástasis pulmonares y quimioterapia con irinotecán/oxaliplatin, Folfrinox, Folfrinox + bevacizumab, bevacizumab + 5-FU/leucovorina, FolFiri, Folfiri + cetuximab y cetuximab solo. El paciente recibió dosis de 16 mg/kg de IMMU-130 por infusión intravenosa lenta cada dos semanas para un total de 17 dosis de tratamiento.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

[0041] En la descripción que sigue, se utilizan una serie de términos y se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión del objeto reivindicado. Los términos que no están expresamente definidos en este documento se utilizan de acuerdo con sus significados simples y ordinarios.

[0042] A menos que se especifique lo contrario, un o una significa "uno o más".

[0043] El término aproximadamente se usa aquí para significar más o menos el diez por ciento (10%) de un valor. Por ejemplo, "alrededor de 100" se refiere a cualquier número entre 90 y 110.

[0044] Un anticuerpo, como se usa en este documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, de origen natural o formada por procesos de recombinación de fragmentos de genes de inmunoglobulina normales) (por ejemplo, un anticuerpo IgG) o una porción de unión a antígeno de una molécula de inmunoglobulina, tal como un fragmento de anticuerpo. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede conjugarse o derivatizarse de otro modo dentro del alcance del objeto reivindicado. Dichos anticuerpos incluyen, entre otros, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (y subformas de IgG4), así como isotipos de IgA. Como se usa a continuación, la abreviatura "MAb" se puede usar indistintamente para referirse a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo monoclonal o anticuerpo multiespecífico.

[0045] Un fragmento de anticuerpo es una porción de un anticuerpo como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv (Fv de cadena sencilla), anticuerpos de dominio único (DAB o VHH) y similares, incluyendo las medias moléculas de IgG4 citadas anteriormente (van der Neut Kolschoten et al. (Science 2007; 317 (14 de septiembre): 1554-1557). Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo de uso se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye proteínas sintéticas o modificadas genéticamente que actúan como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados que consisten en regiones variables, como el Fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera y moléculas polipeptídicas de cadena sencilla recombinantes en las que las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un conector peptídico ("proteínas scFv"). Los fragmentos pueden construirse de diferentes maneras para producir formas de unión multivalentes y/o multiespecíficas.

[0046] Un anticuerpo desnudo es generalmente un anticuerpo completo que no está conjugado con un agente terapéutico. Un anticuerpo desnudo puede mostrar efectos terapéuticos y/o citotóxicos, por ejemplo, mediante funciones dependientes de Fc, como la fijación del complemento (CDC) y ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Sin embargo, otros mecanismos, como la apoptosis, la antiangiogénesis, la actividad antimetastásica, la actividad antiadhesiva, la inhibición de la adhesión heterotípica u homotípica y la interferencia en las vías de señalización, también pueden proporcionar un efecto terapéutico. Los anticuerpos desnudos incluyen anticuerpos policlónicos y monoclonales, anticuerpos naturales o recombinantes, tales como anticuerpos químéricos, humanizados o humanos y fragmentos de los mismos. En algunos casos, un "anticuerpo desnudo" también puede referirse a un fragmento de anticuerpo "desnudo". Tal como se define en el presente documento, "desnudo" es sinónimo de "no conjugado" y significa no unido o conjugado con un agente terapéutico.

5 [0047] Un anticuerpo químérico es una proteína recombinante que contiene los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, incluidas las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de una especie, preferiblemente un anticuerpo de roedor, más preferiblemente un anticuerpo murino, mientras que los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. Para aplicaciones veterinarias, los dominios constantes del anticuerpo químérico pueden derivarse del de otras especies, como primates, gatos o perros.

10 [0048] Un anticuerpo humanizado es una proteína recombinante en la que las CDR de un anticuerpo de una especie; por ejemplo, un anticuerpo murino, se transfieren desde las cadenas variables pesadas y ligeras del anticuerpo murino a los dominios variables pesados y ligeros humanos (regiones marco). Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. En algunos casos, los residuos específicos de la región estructural del anticuerpo humanizado, en particular aquellos que están en contacto o cerca de las secuencias CDR, pueden modificarse, por ejemplo, reemplazarse con los residuos correspondientes del murino, roedor, primate subhumano u otro original. anticuerpo.

15 [0049] Un anticuerpo humano es un anticuerpo obtenido, por ejemplo, de ratones transgénicos que han sido "diseñados" para producir anticuerpos humanos en respuesta a una exposición antigenica. En esta técnica, los elementos de los loci de la cadena pesada y ligera humana se introducen en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones específicas de los loci endógenos de la cadena pesada y la cadena ligera. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para varios antígenos, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen en Green et al., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg y col., *Nature* 368:856 (1994), y Taylor y col., *Int. inmune* 6:579 (1994). También se puede construir un anticuerpo totalmente humano mediante métodos de transfección genética o cromosómica, así como tecnología de presentación en fagos, todos los cuales son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990) para la producción de anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. En esta técnica, los genes de dominio variable de anticuerpos humanos se cloran en marco en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso y se muestran como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. De esta forma, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación de fagos se puede realizar en una variedad de formatos, para su revisión, véase, por ejemplo, Johnson y Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:5564-571 (1993). Los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas *in vitro*. Véanse las patentes EE. UU. números 5.567.610 y 5.229.275.

40 [0050] Un agente terapéutico es un átomo, molécula o compuesto que es útil en el tratamiento de una enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, entre otros, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, inmunoconjungados, fármacos, agentes citotóxicos, agentes proapoptóticos, toxinas, nucleasas (incluidas ADNasas y ARNasas), hormonas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos, o colorantes, radionúclidos, oligonucleótidos, ARN de interferencia, siARN, ARNi, agentes antiangiogénicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, quimiocinas, profármacos, enzimas, proteínas de unión o péptidos o combinaciones de los mismos.

45 [0051] Un inmunoconjungado es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, complejo de anticuerpo o proteína de fusión de anticuerpo que se conjuga con al menos un agente terapéutico. La conjugación puede ser covalente o no covalente. Preferiblemente, la conjugación es covalente.

50 [0052] Tal como se usa en el presente documento, el término proteína de fusión de anticuerpos es una molécula de unión a antígeno producida de forma recombinante en la que uno o más anticuerpos naturales, anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpos se unen a otro resto, como una proteína o un péptido, una toxina, una citoquina, una hormona, etc. En ciertas formas de realización preferidas, la proteína de fusión puede comprender dos o más anticuerpos iguales o diferentes, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos monocatenarios fusionados, que pueden unirse al mismo epítopo, epítopos diferentes en el mismo antígeno, o diferentes antígenos.

60 [0053] Un inmunomodulador es un agente terapéutico que, cuando está presente, altera, suprime o estimula el sistema inmunitario del organismo. Normalmente, un inmunomodulador de uso estimula las células inmunitarias para que proliferen o se activen en una cascada de respuesta inmunitaria, como macrófagos, células dendríticas, células B y/o células T. Sin embargo, en algunos casos, un inmunomodulador puede suprimir la proliferación o activación de células inmunitarias. Un ejemplo de un inmunomodulador como se describe en este documento es una citocina, que es una pequeña proteína soluble de aproximadamente 5-20 kDa que es liberada por una población celular (p. ej., linfocitos T cebados) al entrar en contacto con antígenos específicos, y que actúa como un mediador intercelular entre las células. Como comprenderá el experto en la materia, los ejemplos de citocinas incluyen linfocinas, monocinas, interleucinas y varias moléculas de señalización relacionadas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y los

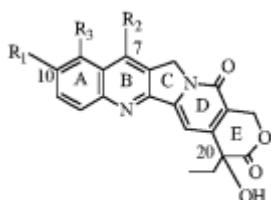
interferones. Las quimiocinas son un subconjunto de las citocinas. Ciertas interleucinas e interferones son ejemplos de citocinas que estimulan la proliferación de células T u otras células inmunitarias. Los interferones ejemplares incluyen interferón- α , interferón- β , interferón- γ e interferón- λ .

5 [0054] CPT es una abreviatura de camptotecina, y como se usa en la presente solicitud, CPT representa la propia camptotecina o un análogo o derivado de la camptotecina, tal como SN-38. Las estructuras de la camptotecina y algunos de sus análogos, con la numeración indicada y los anillos etiquetados con las letras AE, se dan en la fórmula 1 en el Gráfico 1 a continuación.

10 Gráfico 1

[0055]

15

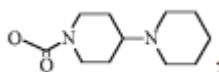


20

(1)

25 CPT: R₁ = R₂ = R₃ = H
10-Hidroxi-CPT: R₁ = OH; R₂ = R₃ = H
CPT-11: R₁ =

30



R₂ = etilo; R₃ = H

SN-38: R₁ = OH; R₂ = etilo; R₃ = H

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

35

Técnicas generales de anticuerpos

40 [0056] Las técnicas para preparar anticuerpos monoclonales contra prácticamente cualquier antígeno diana son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Köhler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975), y Coligan et al. (eds.), *CUTTENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, VOL. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991). El experto en la materia se dará cuenta de que, cuando se van a tratar sujetos humanos, los anticuerpos se unen preferentemente a antígenos humanos. Brevemente, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener inyectando ratones con una composición que comprende un antígeno, extirpando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que producen anticuerpos contra el antígeno, cultivando los clones que producen anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridomas.

45 [0057] Los MAbs se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de hibridomas mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína A o Proteína G Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico. Ver, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y páginas 2.9.1-2.9.3. También, véase Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, VOL. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

50 [0058] Después de la generación inicial de anticuerpos contra el inmunógeno, los anticuerpos pueden secuenciarse y prepararse posteriormente mediante técnicas recombinantes. La humanización y quimerización de anticuerpos murinos y fragmentos de anticuerpos son bien conocidas por los expertos en la técnica, como se analiza a continuación.

55 [0059] El experto en la materia se dará cuenta de que, según la invención, tal como se define en las reivindicaciones, se puede utilizar una amplia variedad de anticuerpos conocidos en la técnica. Los anticuerpos de uso pueden obtenerse comercialmente de una amplia variedad de fuentes conocidas. Por ejemplo, una variedad de líneas de hibridomas secretoras de anticuerpos están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Se ha depositado en la ATCC una gran cantidad de anticuerpos contra varios objetivos de enfermedades, incluidos, entre otros, antígenos asociados a tumores, y/o se han publicado secuencias de región variable y están disponibles para su uso en los métodos y composiciones reivindicados. Véanse, por ejemplo, las

5 patentes EE. UU. números 7.312.318; 7.282.567; 7.151.164; 7.074.403; 7.060.802; 7.056.509; 7.049.060; 7.045.132; 7.041.803; 7.041.802; 7.041.293; 7.038.018; 7.037.498; 7.012.133; 7.001.598; 6.998.468; 6.994.976; 6.994.852; 6.989.241; 6.974.863; 6.965.018; 6.964.854; 6.962.981; 6.962.813; 6.956.107; 6.951.924; 6.949.244; 6.946.129; 6.943.020; 6.939.547; 6.921.645; 6.921.645; 6.921.533; 6.919.433; 6.919.078; 6.916.475; 6.905.681; 6.899.879; 10 6.893.625; 6.887.468; 6.887.466; 6.884.594; 6.881.405; 6.878.812; 6.875.580; 6.872.568; 6.867.006; 6.864.062; 6.861.511; 6.861.227; 6.861.226; 6.838.282; 6.835.549; 6.835.370; 6.824.780; 6.824.778; 6.812.206; 6.793.924; 6.783.758; 6.770.450; 6.767.711; 6.764.688; 6.764.681; 6.764.679; 6.743.898; 6.733.981; 6.730.307; 6.720.155; 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; 15 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; 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; 20 6.340.459; 6.331.175; 6.306.393; 6.254.868; 6.187.287; 6.183.744; 6.129.914; 6.120.767; 6.096.289; 6.077.499; 5.922.302; 5.874.540; 5.814.440; 5.798.229; 5.789.554; 5.776.456; 5.736.119; 5.716.595; 5.677.136; 5.587.459; 5.443.953. 5.525.338. Estos son solo ejemplos y se conocen en la técnica una amplia variedad de otros anticuerpos y sus hibridomas. El experto en la materia se dará cuenta de que las secuencias de anticuerpos o los hibridomas secretores de anticuerpos contra casi cualquier antígeno asociado a una enfermedad pueden obtenerse mediante una simple búsqueda en las bases de datos de ATCC, NCBI y/o USPTO para anticuerpos contra un objetivo de interés asociado a una enfermedad seleccionado. Los dominios de unión a antígeno de los anticuerpos clonados pueden amplificarse, escindirse, ligarse en un vector de expresión, transfecirse en una célula huésped adaptada y usarse para la producción de proteínas, usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Los anticuerpos aislados pueden conjugarse con agentes terapéuticos que inducen roturas de cadenas de ADN, como camptotecinas o antraciclinas, utilizando las técnicas descritas en el presente documento.

Anticuerpos químéricos y humanizados

30 **[0060]** Un anticuerpo químérico es una proteína recombinante en la que las regiones variables de un anticuerpo humano han sido reemplazadas por las regiones variables de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, incluidas las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo de ratón. Los anticuerpos químéricos muestran una inmunogenicidad disminuida y una mayor estabilidad cuando se administran a un sujeto. Los métodos para construir anticuerpos químéricos son bien conocidos en la técnica (*p. ej.*, Leung et al., 1994, *Hybridoma* 13:469).

35 **[0061]** Un anticuerpo monoclonal químérico puede humanizarse transfiriendo las CDR de ratón de las cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a los dominios variables correspondientes de un anticuerpo humano. Las regiones marco de ratón (FR) en el anticuerpo monoclonal químérico también se reemplazan con secuencias FR humanas. Para preservar la estabilidad y la especificidad antigenética del monoclonal humanizado, uno o más residuos FR humanos pueden ser reemplazados por los residuos homólogos de ratón. Pueden usarse 40 anticuerpos monoclonales humanizados para el tratamiento terapéutico de sujetos. Las técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales humanizados son bien conocidas en la técnica. (Ver, *por ejemplo*, Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323; Verhoeven et al., 1988, *Science*, 239:1534; Carter et al., 1992, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE. UU.*, 89:4285; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.*, 1992, 12:437; Tempest et al., 1991, *Biotechnology* 9:266; Singer et al., *J. Immun.*, 1993, 150:2844.)

45 **[0062]** Otras formas de realización de la presente invención como se define en las reivindicaciones pueden referirse a anticuerpos de primates no humanos. Pueden encontrarse técnicas generales para generar anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos, por ejemplo, en Goldenberg et al., WO 91/11465 (1991), y en Losman et al., *Int. J. Cancer* 46: 310 (1990). En otra forma de realización, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humano. 50 Dichos anticuerpos pueden obtenerse de ratones transgénicos que han sido diseñados para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la exposición antigenica, como se analiza a continuación.

Anticuerpos humanos

55 **[0063]** Los métodos para producir anticuerpos completamente humanos utilizando enfoques combinatorios o animales transgénicos transformados con loci de inmunoglobulina humana son conocidos en la técnica (*p. ej.*, Mancini et al., 2004, *New Microbiol.* 27:315-28; Conrad and Scheller, 2005, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:117-26; Brekke and Loset, 2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50). Se espera que dichos anticuerpos totalmente humanos muestren incluso menos efectos secundarios que los anticuerpos químéricos o humanizados y que funcionen *in vivo* como anticuerpos humanos esencialmente endógenos. En ciertas formas de realización de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, se pueden utilizar anticuerpos humanos producidos por dichas técnicas.

60 **[0064]** En una alternativa, la técnica de presentación en fagos puede usarse 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 presenten un estado de enfermedad particular, como el cáncer

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

5 **[0065]** 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, el ARN total se obtuvo de los linfocitos sanguíneos circulantes (*Id.*) Los Fab recombinantes se clonaron de los repertorios de anticuerpos de cadena μ , γ y κ y se insertaron en una biblioteca de presentación de fagos (*Id.*) Los ARN se convirtieron en ADNc y se usaron para producir ADNc de Fab bibliotecas que usan cebadores específicos contra las

10 secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera (Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97). La construcción de la biblioteca se realizó de acuerdo con Andris-Widhopf et al. (2000, en: *Phage Display Laboratory Manual*, Barbas et al. (eds), 1^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY págs. 9.1 a 9.22). Los fragmentos Fab finales se dirigieron con endonucleasas de restricción y se insertaron en el genoma del bacteriófago para crear la biblioteca de presentación de fagos. Dichas bibliotecas pueden examinarse mediante 15 métodos estándar de presentación en fagos. El experto en la materia se dará cuenta de que esta técnica es solo un ejemplo y que puede utilizarse cualquier método conocido para producir y examinar anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos mediante expresión en fagos.

20 **[0066]** En otra alternativa, los animales transgénicos que han sido manipulados genéticamente para producir anticuerpos humanos pueden usarse para generar anticuerpos contra esencialmente cualquier objetivo inmunogénico, usando protocolos de inmunización estándar como se discutió anteriormente. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen en Green et al., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg y col., *Nature* 368:856 (1994), y Taylor y col., *Int. Inmune* 6:579 (1994). Un ejemplo no limitativo de dicho sistema es el 25 **XENOMOUSE®** (p. ej., Green et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23) de Abgenix (Fremont, CA). En **XENOMOUSE®** y animales similares, los genes de anticuerpos de ratón han sido desactivados y reemplazados por genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que el resto del sistema inmunitario del ratón permanece intacto.

30 **[0067]** El **XENOMOUSE®** se transformó con YAC (cromosomas artificiales de levadura) configurados en la línea germinal que contenían porciones de los loci kappa de IgH e Ig humanos, incluida la mayoría de las secuencias de la 35 región variable, junto con genes accesorios y secuencias reguladoras. El repertorio de regiones variables humanas puede usarse para generar células B productoras de anticuerpos, que pueden procesarse en hibridomas mediante técnicas conocidas. Un **XENOMOUSE®** inmunizado con un antígeno diana producirá anticuerpos humanos mediante la respuesta inmunitaria normal, que pueden ser recolectados y/o producidos mediante técnicas estándar discutidas anteriormente. Hay disponible una variedad de cepas de **XENOMOUSE®**, cada una de las cuales es capaz de producir 40 una clase diferente de anticuerpo. Se ha demostrado que los anticuerpos humanos producidos transgénicamente tienen potencial terapéutico, al tiempo que conservan las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos humanos normales (Green et al., 1999). El experto en la materia se dará cuenta de que las composiciones y los métodos reivindicados no se limitan al uso del sistema **XENOMOUSE®** sino que pueden utilizar cualquier animal transgénico que haya sido manipulado genéticamente para producir anticuerpos humanos.

40 *Producción de fragmentos de anticuerpos*

45 **[0068]** Algunas formas de realización de la invención, como se define en las reivindicaciones, pueden referirse a fragmentos de anticuerpos. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpos mediante la escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado $F(ab')_2$. Este fragmento puede escindirse adicionalmente 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 fragmentos monovalentes 3,5S Fab' . Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc . Los métodos ejemplares para producir fragmentos de anticuerpos se describen en las patentes de EE. UU. n.º 4.036.945; Patente de EE. UU. n.º 4.331.647; Nisonoff et al., 1960, *Arch. Biochem. Biophys.*, 89:230; Porter, 1959, *Biochem. J.*, 73:119; Edelman y col., 1967, *METHODS IN ENZYMOLOGY*, página 422 (Academic Press), y Coligan y col. (eds.), 1991, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, (John Wiley & Sons).

55 **[0069]** También se pueden usar otros métodos de escisión de anticuerpos, 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 se reconoce, por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L . Esta asociación puede ser 60 no covalente, como se describe en Inbar et al., 1972, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE. UU.*, 69:2659. Alternativamente, las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o entrecruzadas por productos químicos como el glutaraldehído. Véase Sandhu, 1992, *Crit. Rev. Biotech.*, 12:437.

65 **[0070]** Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un conector peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla ($scFv$) se preparan mediante la construcción de un gen estructural

que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L , conectados por una secuencia conectora de oligonucleótidos. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que posteriormente se introduce en una célula huésped, como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una sola cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFv son bien conocidos en la técnica. Véase

5 Whitlow et al., 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97; Bird y col., 1988, Science, 242:423; Patente de EE. UU. n.º 4.946.778; Pack et al., 1993, Bio/Technology, 11:1271, y Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437.

10 [0071] Otra forma de fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de dominio único (dAb), a veces denominado anticuerpo de cadena única. Las técnicas para producir anticuerpos de dominio único son bien conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Cossins et al., Protein Expression and Purification, 2007, 51:253-59; Shuntao et al., Molec Immunol 2006, 43:1912-19 Tanha y col., J. Biol. Chem. 2001, 276:24774-780). Otros tipos de fragmentos de anticuerpos pueden 15 comprender una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden obtenerse mediante la construcción de genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la 20 región variable a partir del ARN de las células productoras de anticuerpos. Véase Larrick et al., 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106; Ritter et al. (eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, páginas 166-179 (Cambridge University Press); Birch et al., (eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, páginas 137-185 (Wiley-Liss, Inc.).

20 Variaciones de anticuerpos

25 [0072] En ciertas formas de realización, las secuencias de anticuerpos, como las porciones Fc de los anticuerpos, se pueden variar para optimizar las características fisiológicas de los conjugados, como la vida media en suero. Los métodos de sustitución de secuencias de aminoácidos en proteínas son ampliamente conocidos en la técnica, como la mutagénesis dirigida al sitio (p. ej., Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory manual, 2^a ed., 1989). En formas de realización preferidas, la variación puede implicar la adición o eliminación de uno o más sitios de glicosilación en la 30 secuencia Fc (p. ej., Patente de EE. UU. n.º 6.254.868). En otras formas de realización preferidas, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos específicos en la secuencia Fc (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 EE. UU. n.º 7.217.797).

Antígenos diana y anticuerpos ejemplares

35 [0073] En una forma de realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, se usan anticuerpos que reconocen y/o se unen a antígenos humanos que se expresan en niveles elevados en las células diana y que se expresan predominantemente o exclusivamente en células enfermas frente a tejidos normales. Más preferiblemente, los anticuerpos se internalizan rápidamente después de la unión. Un ejemplo de anticuerpo de 40 internalización rápida es el anticuerpo LL1 (anti-CD74), con una tasa de internalización de aproximadamente 8×10^6 moléculas de anticuerpo por célula por día (p. ej., Hansen et al., 1996, Biochem J. 320:293-300). Por lo tanto, un anticuerpo de "internalización rápida" puede ser uno con una tasa de internalización de aproximadamente 1×10^6 a 45 aproximadamente 1×10^7 moléculas de anticuerpo por célula por día. Los anticuerpos de uso en las composiciones y métodos reivindicados pueden incluir MAb con propiedades como las indicadas anteriormente. Ejemplos de 50 anticuerpos de uso para la terapia de, por ejemplo, cáncer incluyen pero no se limitan a LL1 (anti-CD74), LL2 o RFB4 (anti-CD22), veltuzumab (hA20, anti-CD20), rituxumab (anti-CD20), obinutuzumab (GA101, anti-CD20), lambrolizumab (anti-receptor PD-1), nivolumab (anti-receptor PD-1), ipilimumab (anti-CTLA-4), RS7 (glicoproteína-1 anti-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 (una anti-alfa-fetoproteína), R1 (anti-IGF-1R), A19 (anti-CD19), TAG-72 (p. ej., CC49), Tn, J591 o Huj591 (antiPSMA (antígeno de membrana específico de la próstata)), AB-PG1-XG1-026 (dímero anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (un MAb IX antianhidrasa carbónica), L243 (anti-HLA-DR) alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab tiuxetan (anti-CD20); panitumumab (anti-EGFR) tosimumomab (anti-CD20); PAM4 (también conocido como clivatuzumab, anti-mucina) y trastuzumab (anti-ErbB2). Dichos anticuerpos son conocidos en la técnica (p. ej., patentes de EE. UU. n.º 2; 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, 55 7.642.239 y publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20050271671, 20060193865, 20060210475, 20070087001.) Los anticuerpos específicos conocidos de uso incluyen hPAM4 (patente de EE. UU. n.º 7.282.567), hA20 (Patente de EE. UU. n.º 7.151.164), hA19 (Patente de EE. UU. n.º 7.109.304), HIMMU-31 (patente de EE. UU. n.º 7.300.655), hLL1 (patente de EE. UU. n.º 7.312.318), hLL2 (patente de EE. UU. n.º 5.789.554), hMu-9 (patente de EE. UU. n.º de patente 7.612.180), hMN-14 (patente de EE. UU. n.º 6.676.924), hMN-15 (patente de EE. UU. n.º 8.287.865), 60 hR1 (solicitud de patente de EE. UU. 14/061,1767), hRS7 (patente de EE. UU. n.º 7.238.785), hMN-3 (patente de EE. UU. n.º 7.541.440), AB-PG1-XG1-026 (solicitud de patente de EE. UU. 11/983.372, depositada como ATCC PTA-4405 y PTA-4406) y D2/B (WO 2009/130575).

65 [0074] Otros antígenos útiles a los que se pueden dirigir usando los conjugados descritos incluyen anhidrasa carbónica IX, B7, CCL19, CCL21, CSAP, HER-2/neu, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14,

CD15, CD16, CD18, CD19, CD20 (p. ej., C2B8, hA20, 1F5 MAb), CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM5, CEACAM6, CTLA-4, alfafetoproteína (AFP), VEGF (p. ej., AVASTIN®, variante de empalme de fibronectina), fibronectina ED-B (p. ej., L19), 5 EGP-1 (Trop-2), EGP-2 (p. ej., 17-1A), receptor EGF (ErbB1) (p. ej., ERBITUX®, ErbB2, ErbB3, Factor H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, Ga 733, GRO-β, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF), HM1.24, HER-2/neu, insulina factor de crecimiento similar (ILGF), IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IFN-λ, IL-2R, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, IGF-1R, Ia, HM1.24, gangliósidos, HCG, el antígeno HLA-DR al que se une L243, antígenos CD66, es decir, CD66a-d o una combinación de los mismos, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, 10 MIP-1B, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, factor de crecimiento placentario (PIGF), PSA (antígeno prostático específico), PSMA, antígeno PAM4, receptor PD-1, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM, KS-1, Le(y), mesotelina, S100, tenascina, TAC, antígeno Tn, antígenos de Thomas-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, antígenos de angiogénesis tumoral, TNF-α, receptor TRAIL (R1 y R2), Trop- 2, VEGFR, RANTES, T101, así como antígenos de células madre cancerosas, factores del complemento C3, 15 C3a, C3b, C5a, C5 y un producto oncogénico.

[0075] Un análisis exhaustivo de objetivos de antígenos adecuados (designación de grupo o CD) en tumores hematopoyéticos malignos células, como se muestra por citometría de flujo y que puede ser una guía para seleccionar anticuerpos adecuados para la inmunoterapia conjugada con fármacos, es Craig and Foon, Blood prepublicado en 20 línea 15 de enero de 2008; DOL 10.1182/blood-2007-11-120535.

[0076] Los antígenos CD66 consisten en cinco glicoproteínas diferentes con estructuras similares, CD66a-e, codificadas por los miembros de la familia de genes del antígeno carcinoembionario (CEA), BCG, CGM6, NCA, CGM1 y CEA, respectivamente. Estos antígenos CD66 (por ejemplo, CEACAM6) se expresan principalmente en granulocitos, 25 células epiteliales normales del tracto digestivo y células tumorales de diversos tejidos. También se incluyen como dianas adecuadas para los cánceres los antígenos testiculares del cáncer, como NY-ESO-1 (Theurillat et al., Int. J. Cancer 2007; 120(11):2411-7), así como CD79a en la leucemia mieloide (Kozlov et al., Cancer Genet. Cytogenet. 2005; 163(1):62-7) y también enfermedades de células B, y CD79b para linfoma no Hodgkin (Poison et al., Blood 110(2):616-623). Varios de los antígenos antes mencionados se describen en la solicitud provisional de los EE. UU. 30 con número de serie 60/426,379, titulada "Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics", presentada el 15 de noviembre de 2002. Las células madre cancerosas, que son atribuidas a ser poblaciones de células malignas precursoras más resistentes a la terapia (Hill and Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99:1435-40), tienen antígenos que pueden ser objetivo en ciertos tipos de cáncer, como CD 133 en cáncer de próstata (Maitland et al., Ernst Schering Found. Sypos. Proc. 2006; 5:155-79), cáncer de pulmón de células no pequeñas 35 (Donnenberg et al., J. Control Release 2007; 122(3):385-91), y glioblastoma (Beier et al., Cancer Res. 2007; 67(9):4010-5), y CD44 en cáncer colorrectal (Dalerba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 2007; 104(24):10158-63), cáncer de páncreas (Li et al., Cancer Res. 2007; 67(3):1030-7), y en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Prince et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 2007; 104(3):973-8).

[0077] Para la terapia del mieloma múltiple, se han descrito anticuerpos dirigidos 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).

[0078] El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es un importante regulador de la inmunidad innata y adaptativa y de la apoptosis. Se ha informado que CD74 es el receptor endógeno para MIF (Leng et al., 2003, J Exp Med 197:1467-76). El efecto terapéutico de los anticuerpos antagonistas anti-CD74 en las vías intracelulares mediadas por MIF puede ser útil para el tratamiento de una amplia variedad de estados patológicos, como cánceres de vejiga, próstata, mama, pulmón, colon y leucemia linfocítica crónica (p. ej., Meyer-Siegler et al., 2004, BMC Cancer 12:34, 45 Shachar & Haran, 2011, Leuk Lymphoma 52:1446-54); enfermedades autoinmunes 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 aloinjertos renales (Lan, 2008, Nephron Exp Nephrol. 109:e79-83); y numerosas enfermedades inflamatorias (Meyer-Siegler et al., 2009, Mediators Inflamm epub 22 de marzo de 2009; Takahashi et al., 2009, Respir Res 10:33; Milatuzumab (hLL1) es un anticuerpo anti-CD74 ejemplar 50 de uso terapéutico para tratamiento de enfermedades mediadas por MIF.

[0079] Los anticuerpos anti-TNF-α son conocidos en la técnica y pueden ser útiles para tratar enfermedades inmunitarias, tales como enfermedades autoinmunes, disfunción inmunitaria (p. ej., enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órganos) o diabetes. Los anticuerpos conocidos contra TNF-α incluyen el anticuerpo humano CDP571 (Ofei et al., 2011, Diabetes 45:881-85); anticuerpos murinos MTNFA1, M2TNFA1, M3TNFA1, M3TNFABI, 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-α conocidos pueden usarse en los métodos y composiciones reivindicados. Otros anticuerpos de uso para la terapia de enfermedades autoinmunes o de desregulación inmunitaria incluyen, entre otros, anticuerpos 55 de células anti-B tales como veltuzumab, epratuzumab, milatuzumab o hL243; tocilizumab (receptor anti-IL-6);

basiliximab (anti-CD25); daclizumab (anti-CD25); efalizumab (anti-CD11a); muromonab-CD3 (receptor anti-CD3); anti-CD40L (UCB, Bruselas, Bélgica); natalizumab (integrina anti- α 4) y omalizumab (anti-IgE).

5 **[0080]** La diabetes tipo 1 y tipo 2 se puede tratar con anticuerpos conocidos contra antígenos de células B, como CD22 (epratuzumab y hRFB4), CD74 (milatuzumab), CD19 (hA19), CD20 (veltuzumab) o HLA-DR (hL243). (ver, por ejemplo, Winer et al., 2011, *Nature Med* 17:610-18). También se han propuesto anticuerpos anti-CD3 para la terapia de la diabetes tipo 1 (Cernea et al., 2010, *Diabetes Metab Rev* 26:602-05).

10 **[0081]** En otra forma de realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, se usan anticuerpos que se internalizan rápidamente y luego se vuelven a expresar, procesar y presentar en las superficies celulares, lo que permite la captación y acumulación continua del conjugado circulante por parte de la célula. Un ejemplo de un par anticuerpo/antígeno más preferido es LL1, un MAb anti-CD74 (cadena invariable, chaperona específica de clase II, li) (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. números 6.653.104; 7.312.318). El antígeno CD74 está altamente expresado en linfomas de células B (incluido el mieloma múltiple) y leucemias, ciertos linfomas 15 de células T, melanomas, cánceres de colon, pulmón y riñón, glioblastomas y otros tipos de cáncer (Ong et al., *Immunology* 98: 296-302 (1999)). Una revisión del uso de anticuerpos CD74 en el cáncer está contenida en Stein et al., *Clin Cancer Res*. 15 de septiembre de 2007; 13 (18 Pt 2): 5556s-5563s.

20 **[0082]** Las enfermedades que se tratan preferentemente con anticuerpos anti-CD74 incluyen, pero no se limitan a, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, melanoma, cáncer de pulmón, renal, colónico, glioblastoma multiforme, histiocitomas, leucemias mieloídes y mieloma múltiple. La expresión continua del antígeno CD74 durante cortos períodos de tiempo en la superficie de las células diana, seguida de la internalización del antígeno y la reexpresión del antígeno, permite que el anticuerpo dirigido contra LL1 se internalice junto con cualquier resto de fármaco que lleve. Esto permite que se acumule dentro de tales células una concentración alta y terapéutica de conjugado de LL1-fármaco. Los conjugados de LL1-fármaco internalizados pasan por los lisosomas y los endosomas, y la fracción del fármaco se libera en una forma activa dentro de las células diana.

30 **[0083]** Los anticuerpos de uso para tratar enfermedades autoinmunes o disfunciones del sistema inmunológico (p. ej., enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órganos) son conocidas en la técnica y pueden conjugarse con SN-38 usando los métodos y composiciones descritos. Los anticuerpos de uso para tratar la enfermedad de disfunción autoinmune/inmune pueden unirse a antígenos ejemplares que incluyen, entre otros, 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, CD74, TNF-alfa, interferón y HLA-DR. Los anticuerpos que se unen a estos y otros antígenos diana, discutidos anteriormente, pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunes o disfunciones inmunes. Las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse con anticuerpos o inmunoconjungados 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, Henoch-Púrpura de Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nodoso, arteritis de Takayasu, vasculitis asociadas 40 a ANCA, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangiitis obliterante, síndrome de Sjogren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, 45 anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis o alveolitis fibrosante.

50 **[0084]** Los anticuerpos discutidos anteriormente y otros anticuerpos conocidos contra antígenos asociados a enfermedades pueden usarse como conjugados de CPT, más preferiblemente conjugados de SN-38, en la práctica de la invención como se define en las reivindicaciones.

Anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos

55 **[0085]** Los anticuerpos biespecíficos son útiles en varias 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 parte de las células T. Se han usado con éxito anticuerpos biespecíficos que reconocen gliomas y el epitopo CD3 en células T en el tratamiento de tumores cerebrales en pacientes humanos (Nitta, et al. *Lancet*. 1990; 355:368-371). Un anticuerpo biespecífico preferido es un anticuerpo anti-CD3 x anti-CD19. Alternativamente, un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento del mismo puede unirse a un anticuerpo o fragmento contra otro antígeno asociado a células B, como anti-CD3 x anti-CD20, anti-CD3 x anti-CD22, anti-CD3 x anti-HLA-DR o anti-CD3 x anti-CD74. En ciertas formas de realización de la invención como se define en las reivindicaciones, las técnicas y composiciones para la conjugación de agentes terapéuticos descritas en el presente documento pueden usarse con anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos como restos de direccionamiento.

5 [0086] Se conocen numerosos métodos para producir anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 7.405.320. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante el método del cuadroma, que implica la fusión de dos hibridomas diferentes, cada uno de los cuales produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio antigenico diferente (Milstein y Cuello, Nature, 1983; 305:537-540).

10 10 [0087] Otro método para producir anticuerpos biespecíficos usa reticuladores heterobifuncionales para unir químicamente dos anticuerpos monoclonales diferentes (Staerz, et al. Nature, 1985; 314:628-631; Perez, et al. Nature, 1985; 316:354-356). Los anticuerpos biespecíficos también se pueden producir mediante la reducción de cada uno de los dos anticuerpos monoclonales parentales a las respectivas medias moléculas, que luego se mezclan y se dejan reoxidar para obtener la estructura híbrida (Staerz y Bevan. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1986; 83: 1453-1457). Otra alternativa implica el entrecruzamiento químico de dos o tres fragmentos Fab' purificados por separado usando enlazadores apropiados. (Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea 0453082).

15 15 [0088] Otros métodos incluyen mejorar la eficiencia de generar hibridomas híbridos mediante la transferencia génica de distintos marcadores seleccionables a través de vectores lanzadera derivados de retrovirus en los respectivos hibridomas parentales, que se fusionan posteriormente (DeMonte, et al. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1990, 87:2941-2945); o transfección de una línea celular de hibridoma con plásmidos de expresión que contienen los genes de cadena ligera y pesada de un anticuerpo diferente.

20 20 [0089] V_H y V_L afines se pueden unir con un conector peptídico de composición y longitud apropiadas (que generalmente consta de más de 12 residuos de aminoácidos) para formar un Fv monocatenario (scFv) con actividad de unión. Los métodos de fabricación de scFv se describen en las patentes de EE. UU. n.º 4.946.778 y Patente de EE. UU. n.º 5.132.405. La reducción de la longitud del conector peptídico a menos de 12 residuos de aminoácidos evita el emparejamiento de los dominios V_H y V_L en la misma cadena y fuerza el emparejamiento de los dominios V_H y V_L con dominios complementarios en otras cadenas, lo que da como resultado la formación de multímeros funcionales. Las cadenas polipeptídicas de los dominios V_H y V_L que se unen con conectores entre 3 y 12 residuos de aminoácidos forman predominantemente dímeros (denominados diacuerpos). Con enlazadores entre 0 y 2 residuos de aminoácidos, se favorecen los trímeros (denominados triacuerpo) y tetrámeros (denominados tetracuerpo), pero los patrones exactos de oligomerización parecen depender de la composición, así como de la orientación de los dominios V (V_H -enlazador- V_L o V_L -enlazador- V_H), además de la longitud del enlazador.

35 35 [0090] Estas técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos presentan diversas dificultades en términos de bajo rendimiento, necesidad de purificación, baja estabilidad o la mano de obra intensiva de la técnica. Más recientemente, se ha utilizado una técnica conocida como "dock and lock" (DNL) para producir combinaciones de prácticamente todos los anticuerpos deseados, fragmentos de anticuerpos y otras moléculas efectoras (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.ºs. 7.521.056; 7.527.787; 7.534.866; 7.550.143; 7.666.400; 7.858.070; 7.871.622; 7.906.121; 7.906.118; 8.163.291; 7.901.680; 7.981.398; 8.003.111 y 8.034.352). La técnica utiliza dominios de unión a proteínas complementarios, denominados dominios de anclaje (AD) y dominios de dimerización y acoplamiento (DDD), que se unen entre sí y permiten el ensamblaje de estructuras complejas, que van desde dímeros, trímeros, tetrámeros, quintámeros y hexámeros. Estos forman complejos estables con alto rendimiento sin necesidad de una purificación extensa. La técnica DNL permite el ensamblaje de anticuerpos monoespecíficos, biespecíficos o multiespecíficos. Cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica para producir anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos puede utilizarse en la práctica de la invención como se define en las reivindicaciones.

40 40 [0091] En varias formas de realización de la invención como se define en las reivindicaciones, un conjugado como se describe en el presente documento puede ser parte de un anticuerpo multiespecífico compuesto. Dichos anticuerpos pueden contener dos o más sitios de unión a antígeno diferentes, con diferentes especificidades. El compuesto multiespecífico puede unirse a diferentes epítopos del mismo antígeno o, alternativamente, puede unirse a dos antígenos diferentes. Algunas de las combinaciones de objetivos más preferidas incluyen las enumeradas en la Tabla 1. Esta es una lista de ejemplos de combinaciones preferidas, pero no pretende ser exhaustiva.

Tabla 1. Algunos ejemplos de anticuerpos multiespecíficos

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

[0092] Otras combinaciones más, 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 similar a la insulina (ILGF) + anticuerpos CEACAM5, EGP-1 (p. ej., RS-7) + anticuerpos ILGF, CEACAM5 + anticuerpos EGFR, IL6 + anticuerpos CEACAM6, anticuerpos CD74 y HLA-DR, y anticuerpos CD22 y HLA-DR. Dichos anticuerpos no solo necesitan usarse 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 EE. UU. N.ºs 6.083.477; 6.183.744 y 6.962.702 y números de publicación de solicitud de patente de EE. UU. 20030124058; 20030219433; 20040001825; 20040202666; 20040219156; 20040219203; 20040235065; 20050002945; 20050014207; 20050025709; 20050079184; 20050169926; 20050175582; 20050249738; 20060014245 y 20060034759.

DOCK-AND-LOCKO (DNLO)

[0093] En formas de realización preferidas, un anticuerpo bivalente o multivalente está formado como un complejo DOCK-AND-LOCK® (DNL®) (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.ºs 7.521.056; 7.527.787; 7.534.866; 7.550.143; 7.666.400; 7.858.070; 7.871.622; 7.906.121; 7.906.118; 8.163.291; 7.901.680; 7.981.398; 8.003.111 y 8.034.352). En general, la técnica aprovecha las interacciones de unión específicas y de alta afinidad que se producen entre una secuencia de dimerización y dominio de acoplamiento (DDD) de las subunidades reguladoras (R) de cAMP dependiente proteína quinasa (PKA) y una secuencia de dominio de anclaje (AD) derivada de cualquiera de una variedad de proteínas AKAP (Baillie *et al.*, *FEBS Letters*. 2005; 579: 3264. Wong and Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 959). Los péptidos DDD y AD pueden unirse a cualquier proteína, péptido u otra molécula. Debido a 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 estar unida a las secuencias de DDD o AD.

5 [0094] Aunque el complejo DNL® estándar comprende un trímero con dos moléculas unidas a DDD unidas a una molécula unida a AD, las variaciones en la estructura del complejo permiten la formación de dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros y otros multímeros. En algunas formas de realización, el complejo DNL® puede comprender dos o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión que se unen al mismo determinante antigénico o a dos o más抗igenos diferentes. El complejo DNL® también puede comprender uno o más efectores, como proteínas, péptidos, inmunomoduladores, citocinas, interleucinas, interferones, proteínas de unión, ligandos peptídicos, proteínas transportadoras, toxinas, ribonucleasas como onconasa, oligonucleótidos inhibidores como siARN,抗igenos o xenoantígenos, polímeros como PEG, enzimas, agentes terapéuticos, hormonas, agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos, agentes proapoptóticos o cualquier otra molécula o agregado.

10 10 [0095] La PKA, que juega un papel central en una de las vías de transducción de señales mejor estudiadas desencadenadas por la unión del segundo mensajero cAMP a las subunidades R, se aisló por primera vez del músculo esquelético de conejo en 1968 (Walsh et al., J. Biol. Chem. 1968; 243:3763). La estructura de la holoenzima consta de dos subunidades catalíticas mantenidas en forma inactiva por las subunidades R (Taylor, J. Biol. Chem. 1989; 264:8443). Las isoenzimas de PKA se encuentran con dos tipos de subunidades R (RI y RII), y cada tipo tiene isoformas α y β (Scott, Pharmacol. Ther. 1991; 50: 123). Así, las cuatro isoformas de las subunidades reguladoras de PKA son RI α , RI β , RII α y RII β . Las subunidades R se han aislado sólo como dímeros estables y se ha demostrado que el dominio de dimerización consta de los primeros 44 residuos amino-terminales de RII α (Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999; 6:222). Como se analiza a continuación, porciones similares de las secuencias de aminoácidos de otras subunidades reguladoras están involucradas en la dimerización y el acoplamiento, cada una ubicada cerca del extremo N-terminal de la subunidad reguladora. La unión de cAMP a las subunidades R conduce a la liberación de subunidades catalíticas activas para un amplio espectro de actividades de serina/treonina quinasa, que se orientan hacia sustratos seleccionados a través de la compartimentación de PKA a través de su acoplamiento con AKAP (Scott et al., J. Biol. Chem. 1990;265:21561)

25 [0096] Desde que se caracterizó la primera AKAP, la proteína 2 asociada a microtúbulos, en 1984 (Lohmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 1984; 81:6723), más de 50 AKAP que se localizan en varios sitios subcelulares, incluida la membrana plasmática, el citoesqueleto de actina, el núcleo, las mitocondrias y el retículo endoplásmico, se han identificado con diversas estructuras en especies que van desde la levadura hasta los seres humanos (Wong y Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004;5:959). La AD de AKAP para PKA es una hélice anfipática de 14-18 residuos (Carr et al., J. Biol. Chem. 1991; 266:14188). Las secuencias de aminoácidos de AD varían bastante entre los AKAP individuales, y las afinidades de unión reportadas para los dímeros RII varían de 2 a 90 nM (Alto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 2003; 100: 4445). Los AKAP solo se unirán a las subunidades R diméricas. Para RII α humana, la AD se une a una superficie hidrofóbica formada por los 23 residuos amino-terminales (Colledge y Scott, Trends Cell Biol. 1999; 6:216). Por lo tanto, el dominio de dimerización y el dominio de unión a AKAP del RII α humano están ubicados dentro de la misma secuencia de 44 aminoácidos N-terminal (Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999; 6:222; Newlon et al., EMBO J. 2001;20:1651), que se denomina DDD en este documento.

40 [0097] Hemos desarrollado una tecnología de plataforma para utilizar la DDD de las subunidades reguladoras de la PKA humana y la AD de AKAP como un excelente par de módulos enlazadores para acoplar dos entidades cualesquiera, denominadas **A** y **B** en lo sucesivo, en un complejo no covalente, que podría ser más bloqueado en un complejo DNL® a través de la introducción de residuos de cisteína tanto en el DDD como en el AD en posiciones estratégicas para facilitar la formación de enlaces disulfuro. La metodología general del enfoque es la siguiente. La entidad **A** se construye uniendo una secuencia DDD a un precursor de **A**, lo que da como resultado un primer componente que en lo sucesivo se denominará **a**. Debido a que la secuencia DDD efectuaría la formación espontánea de un dímero, **A** estaría compuesto por **a₂**. La entidad **B** se construye uniendo una secuencia de AD a un precursor de **B**, lo que da como resultado un segundo componente que en lo sucesivo se denominará **b**. El motivo dimérico de DDD contenido en **a₂** creará un sitio de acoplamiento para unirse a la secuencia de AD contenida en **b**, facilitando así una fácil asociación de **a₂** y **b** para formar un complejo trimérico binario compuesto por **a₂b**. Este evento de unión se hace irreversible con una reacción posterior para asegurar covalentemente las dos entidades a través de puentes disulfuro, lo que ocurre de manera muy eficiente según el principio de concentración local efectiva porque las interacciones de unión iniciales deberían llevar los grupos tiol reactivos colocados tanto en DDD como en AD en proximidad (Chmura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 2001; 98:8480) para ligar sitio específico. Usando varias combinaciones de enlazadores, módulos adaptadores y precursores, se puede producir y usar una amplia variedad de construcciones DNL® de diferente estequiométría (ver, por ejemplo, US N.ºs 7.550.143; 7.521.056; 7.534.866; 7.527.787 y 7.666.400).

55 60 [0098] Al unir el DDD y el AD lejos de los grupos funcionales de los dos precursores, también se espera que dichas ligaciones específicas del sitio conserven las actividades originales de los dos precursores. Este enfoque es de naturaleza modular y potencialmente se puede aplicar para unir, de forma covalente y específica de sitio, una amplia gama de sustancias, incluidos péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros restos efectores con una amplia gama de actividades. Utilizando el método de proteína de fusión para construir efectores conjugados de AD y DDD descritos en los Ejemplos a continuación, prácticamente cualquier proteína o péptido puede incorporarse en una construcción DNL®. Sin embargo, la técnica no es limitante y pueden utilizarse otros métodos de conjugación.

5 [0099] Se conocen una variedad de métodos para hacer proteínas de fusión, incluyendo la síntesis, hibridación y/o amplificación de ácidos nucleicos para producir un ácido nucleico de doble cadena sintético que codifica una proteína de fusión de interés. Dichos ácidos nucleicos de doble cadena pueden insertarse en vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión mediante técnicas estándar de biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A lab. manual, 2^a ed., 1989). En dichas formas de realización preferidas, el resto AD y/o DDD puede unirse al extremo N-terminal o C-terminal de una proteína o péptido efector. Sin embargo, el experto en la materia se dará cuenta de que el sitio de unión de un resto AD o DDD a un resto efector puede variar, dependiendo de la naturaleza química del resto efector y la(s) parte(s) del resto efector involucradas en su actividad fisiológica. La unión específica del sitio de una variedad de restos efectores se puede realizar utilizando técnicas conocidas en la técnica, como el uso de reactivos de reticulación bivalentes y/u otras técnicas de conjugación química.

10 15 [0100] En varias formas de realización de la invención como se define en las reivindicaciones, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede incorporarse en un complejo DNL®, por ejemplo, uniendo un resto DDD o AD al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, como se describe en detalle a continuación. En formas de realización más preferidas, el resto DDD o AD, más preferentemente el resto AD, puede unirse al extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. 24/13).

Relaciones estructura-función en fracciones AD y DDD

20 25 [0101] Para diferentes tipos de construcciones de DNL®, se pueden utilizar diferentes secuencias de AD o DDD. A continuación, se proporcionan secuencias ejemplares de DDD y AD.

30 35 *DDD1*
SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 1)
DDD2
CGHQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 2)
AD1
QIEYLAQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 3)
AD2
CGQIEYLAQIVDNAIQQQAGC (SEQ ID NO: 4)

40 45 [0102] El experto en la materia se dará cuenta de que DDD1 y DDD2 se basan en la secuencia DDD de la isoforma RIIα humana de la proteína quinasa A. Sin embargo, en formas de realización alternativas, los restos DDD y AD pueden basarse en la secuencia DDD de la forma RIIα humana de proteína quinasa A y una secuencia AKAP correspondiente, como se ejemplifica en DDD3, DDD3C y AD3 a continuación.

50 55 *DDD3*
SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:5)
DDD3C
MSCGGSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:6)
AD3
CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC (SEQ ID NO:7)

60 65 [0103] En otras formas de realización alternativas de la invención como se define en las reivindicaciones, se pueden utilizar otras variantes de secuencia de restos AD y/o DDD en la construcción de los complejos DNL®. Por ejemplo, solo hay cuatro variantes de secuencias DDD de PKA humana, que corresponden a los restos DDD de PKA RIIα, RIIα, RIIβ y RIIβ. La secuencia RIIα DDD es la base de DDD1 y DDD2 descrita anteriormente. Las cuatro secuencias DDD de PKA humana se muestran a continuación. La secuencia DDD representa los residuos 1-44 de RIIα, 1-44 de RIIβ, 12-61 de RIIα y 13-66 de RIIβ. (Tenga en cuenta que la secuencia de DDD1 se modifica ligeramente de la fracción humana PKA RIIα DDD).

70 75 *PKA RIIα*
SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK (SEQ ID NO:8)
PKA RIIβ
SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHF EKLEKEENRQILA (SEQ ID NO: 9)
PKA RIIα
SHIQIPPGLELLQGYTVEVGQQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID NO: 10)
PKA RIIβ
SIEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER (SEQ ID NO: 11)

80 85 [0104] Las relaciones estructura-función de los dominios AD y DDD han sido objeto de investigación. (Véase, por ejemplo, Burns-Hamuro et al., 2005, Protein Sci 14:2982-92; Carr et al., 2001, J Biol Chem 276:17332-38; Alto et al., 2003, Proc Natl Acad Sci EE. UU 100:4445-50; Hundsucker et al., 2006, Biochem Y 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.)

5 [0105] Por ejemplo, Kinderman et al. (2006, Mol Cell 24:397-408) examinaron la estructura cristalina de la interacción de unión de AD-DDD y concluyeron que la secuencia de DDD humana contenía una serie de residuos de aminoácidos conservados que eran importantes en la formación de dímeros o en la unión de AKAP, subrayados en SEQ ID NO: 1 a continuación. (Consulte la Figura 1 de Kinderman et al., 2006). El artesano experto se dará cuenta de que al diseñar variantes de secuencia de la secuencia DDD, sería deseable evitar cambiar cualquiera de los residuos subrayados, mientras que se podrían realizar sustituciones de aminoácidos conservadoras para residuos que son menos críticos para la dimerización y la unión de AKAP.

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 1)

10 [0106] Como se analiza con más detalle a continuación, se han caracterizado sustituciones conservativas de aminoácidos para cada uno de los veinte L-aminoácidos comunes. Por lo tanto, basándose en los datos de Kinderman (2006) y las sustituciones de aminoácidos conservadoras, en la **Tabla 2** se muestran secuencias DDD alternativas potenciales basadas en SEQ ID NO: 1. Al diseñar la **Tabla 2**, solo se consideraron sustituciones de aminoácidos altamente conservadoras. Por ejemplo, los residuos cargados solo se sustituyeron por residuos de la misma carga, los residuos con cadenas laterales pequeñas se sustituyeron por residuos de tamaño similar, las cadenas laterales de hidroxilo solo se sustituyeron por otros hidroxilos, etc. Debido al efecto único de la prolina sobre los aminoácidos estructura secundaria, ningún otro residuo fue sustituido por prolina. Un número limitado de secuencias de restos DDD alternativas potenciales se muestra en SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 31 a continuación. El experto en la materia se dará cuenta de que se puede construir un número casi ilimitado de especies alternativas dentro del género de fracciones DDD mediante técnicas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos comercial o técnicas de mutagénesis dirigida al sitio bien conocidas. El efecto de las sustituciones de aminoácidos sobre la unión del resto de AD también puede determinarse fácilmente mediante ensayos de unión estándar, por ejemplo, como se describe en Alto et al. (2003, Proc Natl Acad Sci EE. UU 100:4445-50).

25 **Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos conservadores en DDD1 (SEQ ID NO:1). Secuencia de consenso divulgada 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	
																					V

30 35 40 45 50 55 THIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 12)
SKIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 13)
SRIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 14)
SHINIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 15)
SHIQIPPGALTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 16)
SHIQIPPGLESELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 17)
SHIQIPPGLTLLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 18)
SHIQIPPGLELLNGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 19)
SHIQIPPGLELLQAYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 20)
SHIQIPPGLELLQGYSVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 21)
SHIQIPPGLELLQGYTVDVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 22)
SHIQIPPGLELLQGYTVEVLKQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 23)
SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRNQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 24)
SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQNQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 25)
SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQQPPELVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 26)
SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQQPPDLVEFLAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 27)
SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQQPPDLVEFLAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 28)
SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQQPPDLVEFIVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 29)
SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQQPPDLVEFIVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 30)
SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQQPPDLVEFADYFTRLREARA (SEQ ID NO: 31)

60 65 [0107] Alto et al. (2003, Proc Natl Acad Sci EE. UU. 100:4445-50) realizaron un análisis bioinformático de la secuencia AD de varias proteínas AKAP para diseñar una secuencia AD selectiva de RII denominada AKAP-IS (SEQ ID NO:3), con una constante de unión para DDD de 0,4 nM. La secuencia de AKAP-IS se diseñó como un péptido antagonista de la unión de AKAP a PKA. Los residuos en la secuencia de AKAP-IS en los que las sustituciones tendían a disminuir la unión a DDD están subrayados en SEQ ID NO:3 a continuación. El experto en la materia se dará cuenta de que al diseñar variantes de secuencia de la secuencia de AD, se evitaría deseablemente cambiar cualquiera de los residuos subrayados, mientras que se podrían realizar sustituciones de aminoácidos conservadoras para residuos que son menos críticos para la unión de DDD. La **Tabla 3** muestra sustituciones de aminoácidos conservadoras potenciales

en la secuencia de AKAP-IS (AD1, SEQ ID NO: 3), similar a la que se muestra para DDD1 (SEQ ID NO: 1) en la **Tabla 2** anterior.

[0108] Un número limitado de secuencias de restos de AD alternativas potenciales se muestra en SEQ ID NO: 32 a SEQ ID NO: 49 a continuación. Nuevamente, un gran número de especies dentro del género de posibles secuencias de restos de AD podrían ser preparadas, probadas y utilizadas por el experto en la materia, basándose en los datos de Alto et al. (2003). Se observa que la figura 2 de Alto (2003) muestra un número incluso grande de posibles sustituciones de aminoácidos que se pueden realizar, mientras se retiene la actividad de unión a los restos DDD, en base a experimentos de unión reales.

10 **AKAP-IS**

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 3)

15 **Tabla 3. Sustituciones de aminoácidos conservadores en AD1 (SEQ ID NO: 3). Secuencia de consenso divulgada como SEQ ID NO:88.**

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

25 NIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 32)

QLEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 33)

QVEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 34)

QIDYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 35)

QIEFLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 36)

QIETLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 37)

30 QIESLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 38)

QIEYIAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 39)

QIEYYVAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 40)

QIEYLARQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 41)

QIEYLAKNIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 42)

35 QIEYLAQIVENAIQQA (SEQ ID NO: 43)

QIEYLAQIVDQAIQQA (SEQ ID NO: 44)

QIEYLAQIVDNAINQA (SEQ ID NO: 45)

QIEYLAQIVDNAIQNA (SEQ ID NO: 46)

QIEYLAQIVDNAIQQL (SEQ ID NO: 47)

40 QIEYLAQIVDNAIQQI (SEQ ID NO: 48)

QIEYLAQIVDNA IQQV (SEQ ID NO: 49)

[0109] Gold et al. (2006, Mol Cell 24:383-95) utilizaron cristalografía y detección de péptidos para desarrollar una secuencia SuperAKAPIS (SEQ ID NO:50), que presenta una selectividad cinco veces mayor para la isoforma RII de PKA en comparación con la isoforma RI. Los residuos subrayados indican las posiciones de las sustituciones de aminoácidos, en relación con la secuencia AKAP-IS, que aumentaron la unión al resto DDD de RII α . En esta secuencia, el residuo Q N-terminal se numera como el residuo número 4 y el residuo A C-terminal es el residuo número 20. Los residuos en los que se podían hacer sustituciones para afectar la afinidad por RII α eran los residuos 8, 11, 15, 16, 18, 19 y 20 (Gold et al., 2006). Se contempla que en ciertas formas de realización alternativas de la invención como se define en las reivindicaciones, la secuencia SuperAKAP-IS puede sustituirse por la secuencia del resto AKAP-IS AD para preparar construcciones DNL®. Otras secuencias alternativas que podrían sustituirse por la secuencia AKAP-IS AD se muestran en SEQ ID NO: 51-53. Las sustituciones relativas a la secuencia AKAP-IS están subrayadas. Se anticipa que, como con la secuencia de AD2 que se muestra en SEQ ID NO: 4, el resto de AD también puede incluir los residuos N-terminales adicionales de cisteína y glicina y los residuos C-terminales de glicina y cisteína.

55 SuperAKAP-IS

QIEYYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID NO:50)

Secuencias AKAP alternativas

60 QIEYKAKQIVDHAIHQQA (SEQ ID NO:51)

QIEYHAKQIVDHAIHQQA (SEQ ID NO:52)

QIEYYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:53)

65 **[0110]** Figura 2 de Gold et al. dio a conocer secuencias de unión a DDD adicionales de una variedad de proteínas AKAP, que se muestran a continuación.

AKAP específicos de RII

[0111]

5 *AKAP-KL*
 PLEYQAGLLVQNAIQQAI (SEQ ID NO:54)
AKAP79
 10 LLIETASSLVKNAIQLSI (SEQ ID NO:55)
AKAP-Lbc
 LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID NO:56)

AKAP específicos de RI

[0112]

15 *AKAPce*
 ALYQFADRFSELVISEAL (SEQ ID NO:57)
RIAD
 20 LEQVANQLADQIIKEAT (SEQ ID NO:58)
PV38
 FEELAWKIAKMIWSDFV (SEQ ID NO:59)

AKAP de doble especificidad

25 [0113]

30 *AKAP 7*
 ELVRLSKRLVENAVLKAV (SEQ ID NO: 60)
MAP2D
 TAEVEVSARIVQVVTAEAV (SEQ ID NO: 61)
DAKAPI
 QIKQAAFQLISQVILEAT (SEQ ID NO: 62)
DAKAP2
 35 LAWKIAKMIWSDFVMQQ (SEQ ID NO: 63)

40 [0114] Stokka et al. (2006, Biochem J 400:493-99) también desarrollaron competidores peptídicos de la unión de AKAP a PKA, que se muestran en 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 mayor afinidad por la isoforma RII de PKA, mientras que RIAD y PV-38 mostraron mayor afinidad por RI.

45 *Ht31*
 DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO: 64)
RIAD
 LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO: 65)
PV-38
 FEELAWKIAKMIWSDFVQQC (SEQ ID NO: 66)

50 [0115] Hundsucker et al. (2006, Biochem J 396:297-306) desarrollaron aún otros competidores peptídicos para la unión de AKAP a PKA, con una constante de unión tan baja como 0,4 nM a la DDD de la forma RII de PKA. Las secuencias de varios péptidos antagonistas de AKAP se proporcionan en la Tabla 1 de Hundsucker et al., reproducidas en la **Tabla 4** a continuación. AKAPIS representa un péptido de unión a la subunidad RII sintético. Todos los demás péptidos se derivan de los dominios de unión a RII de los AKAP indicados.

Tabla 4. Secuencias peptídicas de AKAP
Secuencia peptídica

5	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)
10	AKAP7 δ -wt-pep	PEDAEVLVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:70)
	AKAP7 δ -L304T-pep	PEDAEVLVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:71)
	AKAP7 δ -L308D-pep	PEDAEVLVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:72)
	AKAP7 δ -P-pep	PEDAEVLVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:73)
15	AKAP7 δ -PP-pep	PEDAEVLVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:74)
	AKAP7 δ -L314E-pep	PEDAEVLVRLSKRLVENAVERKAVQQY (SEQ ID NO:75)
	AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA (SEQ ID NO:76)
	AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIEQ (SEQ ID NO:77)
20	AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNQAIQLSIEQL (SEQ ID NO:78)
	AKAP9-pep	LEKQYQEQLEEEAVKIVSMSIAFA (SEQ ID NO:79)
	AKAP10-pep	NTDEAQEEELAWKIAKMKIVSDIMQQA (SEQ ID NO:80)
	AKAP11-pep	VNLDDKAVLAEKIVAAEAIKAEREL (SEQ ID NO:81)
25	AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNIQTAVDQF (SEQ ID NO:82)
	AKAP14-pep	TQDKNYEDELTQVALALVEDVINYA (SEQ ID NO:83)
	Rab32-pep	ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH (SEQ ID NO:84)

30 [0116] Los residuos que estaban altamente conservados entre los dominios AD de diferentes proteínas AKAP se indican a continuación subrayando con referencia a la secuencia IS de AKAP (SEQ ID NO: 3). Los residuos son los mismos que los observados por Alto et al. (2003), con la adición del residuo de alanina C-terminal. (Ver FIG. 4 de Hundsucker et al. (2006).) Las secuencias de antagonistas peptídicos con afinidades particularmente altas por la secuencia RII DDD fueron las de AKAP-IS, AKAP76-wtpep, AKAP7 δ -L304T-pep y AKAP7 δ -L308D-pep.

AKAP-IS

35 QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 3)

40 [0117] Carr et al. (2001, J Biol Chem 276:17332-38) examinaron el grado de homología de secuencia entre diferentes secuencias DDD de unión a AKAP de proteínas humanas y no humanas e identificaron residuos en las secuencias DDD que parecían ser los más conservados entre diferentes DDD. Estos se indican a continuación subrayando con referencia a la secuencia humana PKA RII α DDD de SEQ ID NO:1. Los residuos que se conservaron particularmente se indican en cursiva. Los residuos se superponen, pero no son idénticos a los sugeridos por Kinderman et al. (2006) como importante para la unión a proteínas AKAP. El experto en la materia se dará cuenta de que al diseñar variantes de secuencia de DDD, lo más preferible sería evitar cambiar los residuos más conservados (en cursiva), y también sería preferible evitar cambiar los residuos conservados (subrayados), mientras que las sustituciones conservativas de aminoácidos pueden considerarse para residuos que no están subrayados ni en cursiva.

45 SHIQ₁PPGLTELLQGYTVEVLRQ₂QPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

50 [0118] Un conjunto modificado de sustituciones de aminoácidos conservadoras para la secuencia DDD1 (SEQ ID NO: 1), basado en los datos de Carr et al. (2001) se muestra en la **Tabla 5**. Incluso con este conjunto reducido de secuencias sustituidas, existen numerosas secuencias de restos DDD alternativas posibles que pueden ser producidas, probadas y utilizadas por el experto en la materia sin experimentación indebida. El experto en la materia podría derivar fácilmente tales secuencias de aminoácidos de DDD alternativas como las descritas anteriormente para la **Tabla 2** y la **Tabla 3**.

55

Tabla 5. Sustituciones de aminoácidos conservadores en DDD1 (SEQ ID NO:1). Secuencia de consenso divulgada como SEQ ID NO:89.

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

20 [0119] El experto en la materia se dará cuenta de que estas y otras sustituciones de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de DDD o AD pueden utilizarse para producir especies alternativas dentro del género de fracciones de AD o DDD, usando técnicas que son estándar en el campo y solo experimentación de rutina.

25 Alotipos de anticuerpos

30 [0120] La inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos está asociada con un mayor riesgo de reacciones a la infusión y una menor duración de la respuesta terapéutica (Baert et al., 2003, N Engl J Med 348:602-08). El grado en que los anticuerpos terapéuticos inducen una respuesta inmunitaria en el huésped puede estar determinado en parte por el allotipo del anticuerpo (Stickler et al., 2011, Genes and Immunity 12:213-21). El allotipo del anticuerpo está relacionado con las variaciones de la secuencia de aminoácidos en ubicaciones específicas en las secuencias de la región constante del anticuerpo. Los allotipos de anticuerpos IgG que contienen una región constante de tipo y de cadena pesada se denominan allotipos Gm (1976, J Immunol 117:1056-59).

35 [0121] Para los anticuerpos humanos IgG1 comunes, el allotipo más prevalente es G1m1 (Stickler et al., 2011, Genes and Immunity 12:213-21). Sin embargo, el allotipo G1m3 también ocurre con frecuencia en caucásicos (*Id.*). Se ha informado que los anticuerpos G1m1 contienen secuencias allotípicas que tienden a inducir una respuesta inmunitaria cuando se administran a receptores que no son G1m1 (nG1m1), como los pacientes G1m3 (*Id.*). Los anticuerpos de allotipo distintos de G1m1 no son tan inmunogénicos cuando se administran a pacientes G1m1 (*Id.*).

40 [0122] El allotipo humano G1m1 comprende los aminoácidos ácido aspártico en la posición Kabat 356 y leucina en la posición Kabat 358 en la secuencia CH3 de la cadena pesada IgG1. El allotipo nG1m1 comprende los aminoácidos ácido glutámico en la posición de Kabat 356 y metionina en la posición de Kabat 358. Tanto los allotipos G1m1 como nG1m1 comprenden un residuo de ácido glutámico en la posición de Kabat 357 y los allotipos a veces se denominan allotipos DEL y EEM. Se muestra un ejemplo no limitante de las secuencias de la región constante de la cadena pesada para los anticuerpos allotipo G 1m 1 y nG 1m 1 para los anticuerpos ejemplares rituximab (SEQ ID NO: 85) y veltuzumab (SEQ ID NO: 86).

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

55 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
60 SFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

65 Región variable de cadena pesada de veltuzumab (SEQ ID NO: 86)

5 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 10 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 15 [0123] Jefferis y Lefranc (2009, mAb 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 residuo de arginina en la posición 214 de Kabat, en comparación con un residuo de lisina en Kabat 214 en el alotipo G1m17. El alotipo nG 1m 1,2 se caracterizó por ácido glutámico en la posición de Kabat 356, metionina en la posición de Kabat 358 y alanina en la posición de Kabat 431. El alotipo G1m1,2 se caracterizó por ácido aspártico en la posición de Kabat 356, 20 leucina en la posición de Kabat 358 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) informaron 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 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.
- 25 [0124] Con respecto a los anticuerpos terapéuticos, veltuzumab y rituximab son, respectivamente, anticuerpos IgG1 humanizados y químéricos contra CD20, de uso para la terapia de una amplia variedad de neoplasias malignas hematológicas. La **Tabla 6** compara las secuencias alotípicas de rituximab frente a veltuzumab. Como se muestra en la **Tabla 6**, rituximab (G1m17,1) es un alotipo IgG1 de 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 (ver, por ejemplo, Morschhauser et al., 2009, J Clin Oncol 27:3346-53; Goldenberg et al., 2009, Blood 113:1062-70; Robak & Robak, 2011, BioDrugs 25:13-25), efecto que se ha atribuido a la diferencia entre anticuerpos humanizados y químéricos. Sin embargo, la diferencia en los alotipos entre los alotipos EEM y DEL probablemente también explica la menor inmunogenicidad de veltuzumab.

35

	Alotipo completo	Posición de la cadena pesada y alotipos asociados						
		214 (alotipo)	3561358 (alotipo)	431 (alotipo)				
	Rituximab	G1m17,1	k	17	O/I	1	A	-
	Veltuzumab	G1m3	R	3	E/M	-	A	-

- 40 [0125] Para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos en individuos de genotipo nG 1m 1, es deseable seleccionar el alotipo del anticuerpo para que corresponda al alotipo G1m3, caracterizado por arginina en Kabat 214, 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 encontró que la administración subcutánea repetida de anticuerpos G1m3 durante un largo período de tiempo no dio como resultado una respuesta inmunitaria significativa. En formas de realización alternativas, la cadena pesada de IgG4 humana en común con el alotipo G1m3 tiene arginina en Kabat 214, ácido glutámico en Kabat 356, metionina en Kabat 359 y alanina en Kabat 431. Dado que la inmunogenicidad parece relacionarse al menos en parte con los residuos en esas ubicaciones, el uso de la secuencia de la región constante de la cadena pesada de IgG4 humana para anticuerpos terapéuticos también es una forma de realización preferida. Las combinaciones de anticuerpos IgG1 G1m3 con anticuerpos IgG4 también pueden ser útiles para la administración terapéutica.

Sustituciones de aminoácidos

- 55 [0126] En formas de realización alternativas, los métodos y composiciones descritos pueden implicar la producción y el uso de proteínas o péptidos con uno o más residuos de aminoácidos sustituidos. Por ejemplo, las secuencias de DDD y/o AD usadas para hacer construcciones de DNL® pueden modificarse como se discutió anteriormente.
- 60 [0127] El experto en la materia 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 de aminoácidos conservativas). Las propiedades de los diversos aminoácidos y el efecto de la sustitución de aminoácidos sobre la estructura y función de la proteína han sido objeto de extensos estudios y conocimientos en la técnica.

[0128] Por ejemplo, se puede considerar 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 base a sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte & Doolittle, 1982), estos son: 5 isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Al hacer sustituciones conservativas, se prefiere el uso de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , se prefieren más dentro de ± 1 y se prefieren aún más dentro de $\pm 0,5$.

10 **[0129]** La sustitución de aminoácidos también puede tener en cuenta la hidrofilia del residuo de aminoácido (p. ej., patente de EE. UU. n.º 4.554.101). Se han asignado valores de hidrofilia a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0); glutamato (+3,0); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 +,-1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se prefiere la sustitución de aminoácidos por otros de hidrofilicidad similar.

15 **[0130]** Otras consideraciones incluyen el tamaño de la cadena lateral del aminoácido. Por ejemplo, generalmente no sería preferible reemplazar un aminoácido con una cadena lateral compacta, como glicina o serina, con un aminoácido con una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, triptófano o tirosina. También se considera el efecto de 20 varios residuos de aminoácidos en la estructura secundaria de la proteína. Mediante estudios empíricos, se ha determinado y se conoce en la técnica el efecto de diferentes residuos de aminoácidos sobre la tendencia de los dominios proteicos a adoptar una estructura secundaria de hélice alfa, hoja beta o giro inverso (véase, por ejemplo, Chou & Fasman, 1974, Biochemistry, 13:222-245, 1978, Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276, 1979, Biophys. J., 26:367-384).

25 **[0131]** Sobre la base de tales consideraciones y extensos estudios empíricos, 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. Alternativamente: Ala (A) leu, ile, val; Arg (R) gln, asn, lys; Asn (N) his, asp, lys, arg, gln; Asp (D) asn, glu; Cys (C) ala, ser; Gln (Q) glu, asn; Glu (E) gln, asp; Gly (G) ala; Su (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.

30 **[0132]** Otras consideraciones para las sustituciones de aminoácidos incluyen si el residuo está ubicado o no en el interior de una proteína o si está expuesto al solvente. Para residuos interiores, las sustituciones conservadoras incluirían: Asp y Asn; Ser y Thr; ser y ala; Thr y Ala; Ala y Gly; Ile y Val; Val y Leu; Leu e Ile; Leu y Met; Phé y Tyr; Tyr y Trp. (Consulte, por ejemplo, el sitio web de PROWL en rockefeller.edu) Para residuos expuestos a solventes, las 35 sustituciones conservadoras incluirían: Asp y Asn; Asp y Glú; 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; Phé y Tyr. (Id.) Se han construido varias matrices para ayudar en la selección de sustituciones de aminoácidos, como la matriz de puntuación PAM250, la matriz de Dayhoff, la matriz de Grantham, la matriz de McLachlan, la matriz de Doolittle, la matriz de Henikoff, la matriz de Miyata, la matriz de Fitch, la matriz de Jones, Rao matriz, matriz de Levin y matriz de Risler (Idem.)

40 **[0133]** Al determinar las sustituciones de aminoácidos, también se puede considerar la existencia de enlaces intermoleculares o intramoleculares, como la formación de enlaces iónicos (puentes salinos) entre residuos con carga positiva (p. ej., His, Arg, Lys) y residuos con carga negativa (p. ej., Asp, Glu) o enlaces disulfuro entre residuos de cisteína cercanos.

45 **[0134]** Los métodos para sustituir cualquier aminoácido por cualquier otro aminoácido en una secuencia de proteína codificada están bien conocidos y objeto de experimentación rutinaria para el experto en la materia, por ejemplo mediante la técnica de mutagénesis dirigida al sitio o mediante síntesis y ensamblaje de oligonucleótidos que codifican un aminoácido sustitución y empalme en una construcción de vector de expresión.

50 Avímeros

55 **[0135]** En ciertas formas de realización de la invención, como se define en las reivindicaciones, los restos de unión descritos en el presente documento pueden comprender una o más secuencias de avímero. Los avímeros son una clase de proteínas de unión algo similares a los anticuerpos en sus afinidades y especificidades por varias moléculas diana. Fueron desarrollados a partir de dominios de receptores extracelulares humanos mediante reproducción aleatoria de exones *in vitro* y presentación en fagos. (Silverman et al., 2005, Nat. Biotechnol. 23:1493-94; Silverman et al., 2006, Nat. Biotechnol. 24:220). Las proteínas de múltiples dominios resultantes pueden comprender múltiples dominios de unión independientes, que pueden mostrar una afinidad (en algunos casos subnanomolar) y una especificidad mejoradas en comparación con las proteínas de unión de un solo epítopo. (Id.) En varias formas de realización, los avímeros se pueden unir a, por ejemplo, secuencias DDD y/o AD para usar en los métodos y

composiciones reivindicados. Se describen detalles adicionales sobre los métodos de construcción y uso de avimeros, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 y 20050221384.

5 Exhibición de fagos

[0136] Ciertas formas de realización de la invención como se define en las reivindicaciones pueden abarcar péptidos de unión y/o miméticos de péptidos de diversas moléculas, células o tejidos diana. Los péptidos de unión pueden identificarse mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, entre otros, la técnica de expresión en fagos. Se conocen bien en la técnica diversos métodos de presentación en fagos y técnicas para producir diversas poblaciones de péptidos. Por ejemplo, la patente de EE. UU. números 5.223.409; 5.622.699 y 6.068.829 describen métodos para preparar una biblioteca de fagos. La técnica de presentación en fagos implica la manipulación genética de bacteriófagos para que se puedan expresar pequeños péptidos en su superficie (Smith y Scott, 1985, *Science* 228:1315-1317; Smith y Scott, 1993, *Meth. Enzymol.* 21:228-257). Además de los péptidos, en la superficie de las partículas de fago también pueden mostrarse dominios de proteínas más grandes, como anticuerpos monocatenarios (Arap et al., 1998, *Science* 279:377-380).

[0137] Las secuencias de aminoácidos dirigidas selectivas para un órgano, tejido, tipo de célula o molécula diana determinados pueden aislarse mediante paneo (Pasqualini y Ruoslahti, 1996, *Nature* 380:364-366; Pasqualini, 1999, *The Quart. J. Nucl. Med.* 43:159-162). En resumen, se administra una biblioteca de fagos que contienen péptidos dirigidos putativos a un organismo intacto o a órganos, tejidos, tipos de células o moléculas diana aisladas y se recogen muestras que contienen fagos unidos. El fago que se une a una diana puede eluirse de un órgano, tejido, tipo de célula o molécula diana diana y luego amplificarse cultivándolos en la bacteria huésped.

[0138] El fago se puede propagar en la bacteria huésped entre rondas de cribado. En lugar de ser lisadas por el fago, la bacteria puede secretar múltiples copias del fago que muestran un inserto particular. Si se desea, el fago amplificado puede exponerse de nuevo a los órganos, tejidos, tipos de células o moléculas diana diana y recogerse para rondas adicionales de cribado. Se pueden realizar múltiples rondas de cribado hasta que se obtenga una población de aglutinantes selectivos o específicos. La secuencia de aminoácidos de los péptidos puede determinarse mediante la secuenciación del ADN correspondiente al inserto del péptido dirigido en el genoma del fago. El péptido dirigido identificado puede entonces producirse como un péptido sintético mediante técnicas estándar de química de proteínas (Arap et al., 1998, Smith et al., 1985).

[0139] Se puede usar un protocolo de sustracción para reducir aún más la unión de fagos de fondo. El propósito de la sustracción es eliminar fagos de la biblioteca que se unen a objetivos distintos del objetivo de interés. Alternativamente, la biblioteca de fagos se puede examinar previamente frente a una célula, tejido u órgano de control. Por ejemplo, los péptidos de unión a tumores pueden identificarse después de preseleccionar una biblioteca frente a una línea celular normal de control. Después de la sustracción, la biblioteca puede examinarse frente a la molécula, célula, tejido u órgano de interés. Se conocen y se pueden usar otros métodos de protocolos de sustracción, por ejemplo, como se describe en las patentes EE. UU. números 5.840.841, 5.705.610, 5.670.312 y 5.492.807.

Aptámeros

[0140] Un resto de direccionamiento de uso puede ser un aptámero. Los métodos para construir y determinar las características de unión de los aptámeros son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, dichas técnicas se describen en las patentes EE. UU. números 5.582.981, 5.595.877 y 5.637.459. Los métodos para la preparación y selección de aptámeros que se unen a dianas particulares de interés son bien conocidos, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. n.º 5.475.096 y Patente de EE. UU. n.º 5.270.163.

[0141] Los aptámeros se pueden preparar mediante cualquier método conocido, incluidos los métodos sintéticos, recombinantes y de purificación, y se pueden usar solos o en combinación con otros ligandos específicos para el mismo objetivo. En general, se necesita un mínimo de aproximadamente 3 nucleótidos, preferiblemente al menos 5 nucleótidos, para efectuar la unión específica. Pueden ser factibles aptámeros de secuencias más cortas que 10 bases, aunque pueden preferirse aptámeros de 10, 20, 30 ó 40 nucleótidos.

[0142] Los aptámeros pueden aislarse, secuenciarse y/o amplificarse o sintetizarse como moléculas de ADN o ARN convencionales. Alternativamente, los aptámeros de interés pueden comprender oligómeros modificados. Cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los aptámeros puede reemplazarse por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse con un grupo protector estándar o activarse para preparar enlaces adicionales con otros nucleótidos, o puede conjugarse con soportes sólidos. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos, como P(O)O reemplazado por P(O)S, P(O)NR 2, P(O)R, P(O)OR', CO, o CNR2, donde R es H o alquilo (1-20C) y R' es alquilo (1-20C); además, este grupo puede unirse a nucleótidos adyacentes a través de O o S. No todos los enlaces en un oligómero necesitan ser idénticos.

Aficuerpos y Fynómeros

[0143] Ciertos ejemplos pueden utilizar aficuerpos en lugar de anticuerpos. Los aficuerpos están disponibles comercialmente en Affibody AB (Solna, Suecia). Los aficuerpos son proteínas pequeñas que funcionan como miméticos de anticuerpos y son útiles para unir moléculas diana. Los aficuerpos se desarrollaron mediante ingeniería

5 combinatoria en un andamio de proteína alfa helicoidal (Nord et al., 1995, *Protein Eng* 8:601-8; Nord et al., 1997, *Nat Biotechnol* 15:772-77). El diseño del aficuerpo se basa en una estructura de haz de tres hélices que comprende el dominio de unión a IgG de la proteína A (Nord et al., 1995; 1997). Se pueden producir aficuerpos con una amplia gama de afinidades de unión mediante la aleatorización de trece aminoácidos implicados en la actividad de unión a Fc de la proteína A bacteriana (Nord et al., 1995; 1997). Después de la aleatorización, la biblioteca amplificada por PCR se

10 clonó en un vector de fagémido para el cribado mediante la presentación en fago de las proteínas mutantes. La biblioteca de presentación en fagos puede examinarse frente a cualquier antígeno conocido, usando técnicas de selección de presentación en fagos estándar (p. ej., Pasqualini y Ruoslahti, 1996, *Nature* 380:364-366; Pasqualini, 1999, *Quart. J. Nucl. Med.* 43:159- 162), con el fin de identificar uno o más aficuerpos contra el antígeno diana.

15 **[0144]** Se ha demostrado que un aficuerpo marcado con ¹⁷⁷Lu específico para HER2/neu se dirige a xenoinjertos que expresan HER2 *in vivo* (Tolmachev et al., 2007, *Cancer Res* 67:2773-82). Aunque la toxicidad renal debida a la acumulación del compuesto radiomarcado de bajo peso molecular fue inicialmente un problema, la unión reversible a la albúmina redujo la acumulación renal, lo que permitió la terapia basada en radionucleidos con aficuerpo marcado (*Id.*).

20 **[0145]** Recientemente se ha demostrado la viabilidad de utilizar aficuerpos radiomarcados para la obtención de imágenes de tumores *in vivo* (Tolmachev et al., 2011, *Bioconjugate Chem* 22:894-902). Un NOTA derivado de maleimida se conjugó con el aficuerpo anti-HER2 y se marcó radiactivamente con ¹¹¹In (*Id.*). La administración a ratones que portaban el xenoinjerto de DU-145 que expresaba HER2, seguida de imágenes de cámara gamma, permitió la visualización del xenoinjerto (*Id.*).

25 **[0146]** Los fenómeros también pueden unirse a antígenos diana con una afinidad y especificidad similares a las de los anticuerpos. Los fenómeros se basan en el dominio Fyn SH3 humano como andamio para el ensamblaje de moléculas de unión. El dominio Fyn SH3 es una proteína de 63 aminoácidos completamente humana que se puede producir en bacterias con altos rendimientos. Los fenómeros se pueden unir para producir una proteína de unión multiespecífica con afinidades por dos o más dianas antigenéticas diferentes. Los fenómeros están disponibles comercialmente en COVAGEN AG (Zurich, Suiza).

30 **[0147]** El experto en la materia se dará cuenta de que se pueden usar aficuerpos o fenómeros como moléculas de direccionamiento en la práctica de los métodos y composiciones reivindicados.

Protocolos de conjugación

35 **[0148]** El protocolo de conjugación preferido se basa en una reacción de tiol-maleimida, tiol-vinilsulfona, tiol-bromoacetamida o tiol-yodoacetamida que es fácil a pH neutro o ácido. Esto evita la necesidad de condiciones de pH más altas para las conjugaciones como, por ejemplo, serían necesarias cuando se usan ésteres activos. Más detalles de los protocolos de conjugación ejemplares se describen a continuación en la sección de Ejemplos.

Tratamiento terapéutico

40 **[0149]** En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o inmunoconjungado como se describe en el presente documento a un sujeto, preferiblemente en combinación con un inhibidor de PARP, un inhibidor de microtúbulos, un inhibidor de quinasa de Bruton y/o o inhibidor de PI3K. Las enfermedades que se pueden tratar con los anticuerpos o inmunoconjungados descritos en este documento incluyen, entre otras, tumores malignos 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, leucemia de células pilosas) usando, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD22 como el MAbs hLL2 (epratuzumab, consulte la Patente de EE. UU. N° 6.183.744), contra otro epítopo CD22 (hRFB4) o anticuerpos contra otros antígenos de células B, como CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD37, CD40, CD40L, CD52, CD74, CD80 o HLA-DR. Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinomas del epitelio del sistema digestivo derivado del endodermo, cánceres como el cáncer de mama y el cáncer de pulmón de células no pequeñas y otros carcinomas, sarcomas, tumores gliales, leucemias mieloídes, etc. En particular, los anticuerpos contra un antígeno, por ejemplo, un antígeno oncofetal, producido por o asociado con un tumor sólido maligno o neoplasia hematopoyética, por ejemplo, una neoplasia 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 se utilizan ventajosamente un tumor linfático, un sarcoma o un melanoma. Dichas terapias pueden administrarse una o varias veces, según el estado de la enfermedad y la tolerabilidad del conjugado, y también pueden usarse opcionalmente en combinación con otras modalidades terapéuticas, como cirugía, radiación externa, radioinmunoterapia, inmunoterapia, quimioterapia, terapia antisentido,

interferencia Terapia de ARN, terapia génica y similares. Cada combinación se adaptará al tipo de tumor, estadio, condición del paciente y terapia previa, y otros factores considerados por el médico tratante.

[0150] Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (es decir, vertebrados e invertebrados) incluidos, entre otros, mamíferos, incluidos los seres humanos. No se pretende que el término se limite a una edad o sexo en particular. Por lo tanto, el término abarca sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, ya sean hombres o mujeres. Las dosis proporcionadas en este documento son para humanos, pero se pueden ajustar al tamaño de otros mamíferos, así como a niños, de acuerdo con el peso o el tamaño del metro cuadrado. Cuando se administra un anticuerpo o inmunoconjungado a un sujeto humano, el experto en la materia se dará cuenta de que el antígeno diana al que se une el anticuerpo o el inmunoconjungado será un antígeno humano.

[0151] En una forma de realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, el inmunoconjungado que comprende un anticuerpo antiEGP-1 (anti-Trop-2) es el Mab hRS7 que puede usarse 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 la Patente de Estados Unidos n.º 7.238.785; 7.517.964 y 8.084.583. Un anticuerpo 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 CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 93); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO: 94) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO: 95).

[0152] Los anticuerpos o inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo anti-CEACAM5 (p. ej., hMN-14, labretuzumab) y/o un anticuerpo anti-CEACAM6 (p. ej., hMN-3 o hMN-15) pueden usarse para tratar cualquiera de una variedad de cánceres que expresan CEACAM5 y/o CEACAM6, como se describe en las Patentes de EE. UU. Nos. 7.541.440; 7.951.369; 5.874.540; 6.676.924 y 8.267.865. Los tumores sólidos que se pueden tratar con anti-CEACAM5, anti-CEACAM6 o una combinación de ambos incluyen, entre otros, mama, pulmón, páncreas, esófago, tiroides medular, ovario, colon, recto, vejiga urinaria, boca y cánceres de estómago. La mayoría de los carcinomas, incluidos los cánceres gastrointestinales, respiratorios, genitourinarios y de mama, expresan CEACAM5 y pueden tratarse con los anticuerpos o inmunoconjungados del sujeto. Un anticuerpo hMN-14 es un anticuerpo humanizado que comprende secuencias CDR de región variable de cadena ligera CDR1 (KASQDVGTSA; SEQ ID NO: 96), CDR2 (WTSTRHT; SEQ ID NO: 97) y CDR3 (QQYSLYRS; SEQ ID NO: 98), y las secuencias CDR de 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 región variable de cadena ligera CDR1 (RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO: 102), CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO: 103) y CDR3 (FQGSHVPPT, SEQ ID NO: 104) y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 105), CDR2 (WINTYTGEPTYADDKG, SEQ ID NO: 106) y CDR3 (KGWMDFNSSLDY, SEQ ID NO: 107). Un anticuerpo hMN-15 es un anticuerpo humanizado que comprende secuencias CDR de región variable de cadena ligera SASSRVSYIH (SEQ ID NO: 108); GTSTLAS (SEQ ID NO: 109); y QQWSYNPPT (SEQ ID NO: 110); y secuencias CDR de región variable de cadena pesada DYYMS (SEQ ID NO: 111); FIANKANGHTTDYSPSVKG (SEQ ID NO: 112); y DMGIRWNFDV (SEQ ID NO: 113).

[0153] Los anticuerpos o inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo anti-CD74 (p. ej., hLL1, milatuzumab, descritos en las patentes de EE. limitado a cáncer renal, de pulmón, intestinal, de estómago, de mama, de próstata o de 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 CDR de cadena ligera CDR1 (RSSQSLVHRNGNTYLH; SEQ ID NO: 114), CDR2 (TVSNRFS; SEQ ID NO: 115) y CDR3 (SQSSHVPPT; SEQ ID NO: 116) y la cadena pesada secuencias CDR de región variable CDR1 (NYGVN; SEQ ID NO: 117), CDR2 (WINPNTGEPTFDDDFKG; SEQ ID NO: 118) y CDR3 (SRGKNEAWFAY; SEQ ID NO: 119). Los anticuerpos o inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo anti-CD22 (p. ej., hLL2, epratuzumab, descritos en las patentes de EE. variedad de cánceres que expresan CD22, incluidos, entre otros, formas indolentes de linfomas de células B, formas agresivas de linfomas de células B, leucemias linfáticas crónicas, leucemias linfáticas agudas, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma folicular o Linfoma difuso de células B. Un anticuerpo hLL2 es un anticuerpo humanizado que comprende secuencias CDR de cadena ligera CDR1 (KSSQSVLYSANHKYLA, SEQ ID NO: 120), CDR2 (WASTRES, SEQ ID NO: 121) y CDR3 (HQYLSSWTF, SEQ ID NO: 122) y la cadena pesada CDR secuencias CDR1 (SYWLH, SEQ ID NO: 123), CDR2 (YINPRNDYTEYNQNFKD, SEQ ID NO: 124) y CDR3 (RDITTFY, SEQ ID NO: 125).

[0154] Los anticuerpos o inmunoconjungados que comprenden anticuerpos anti-CSAp, tales como el MAb hMu-9, pueden usarse para tratar cánceres colorrectales, pancreáticos y de ovario como se describe en las Patentes de EE. UU. N.ºs 6.962.702; 7.387.772; 7.414.121; 7.553.953; 7.641.891 y 7.670.804. Además, los anticuerpos o inmunoconjungados que comprenden el mAb hPAM4 se pueden usar para tratar el cáncer de páncreas u otros tumores sólidos, como se describe en las patentes EE. UU. números 7.238.786 y 7.282.567. Un anticuerpo hMu-9 es un anticuerpo humanizado que comprende secuencias CDR de cadena ligera CDR1 (RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO: 126), CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO: 127) y CDR3 (FQGSRVPYT, SEQ ID NO: 128), y secuencias CDR de cadena variable CDR1 (EYVIT, SEQ ID NO: 129), CDR2 (EIYPGSGSTSNEKFK, SEQ ID NO: 130) y CDR3 (EDL, SEQ ID NO: 131). Un anticuerpo hPAM4 es un anticuerpo humanizado que comprende secuencias CDR de 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 CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO: 135); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO: 136) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO: 137).

5 **[0155]** Los anticuerpos o inmunoconjungados que comprenden un MAb anti-alfa fetoproteína (AFP), como IMMU31, pueden usarse para tratar carcinoma hepatocelular, tumores de células germinales y otros tumores productores de AFP usando formas de anticuerpos humanizados, químéricos y humanos, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 7.300.655. Un anticuerpo IMMU31 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (SYVIH, SEQ ID NO: 138), CDR2 (YIHPYNGGTYNEKFKG, SEQ ID NO: 139) y CDR3 (SGGGDPFAY, SEQ ID NO: 140) y la cadena ligera CDR1 (KASQDINKYIG, SEQ ID NO: 141), CDR2 (YTSALLP, SEQ ID NO: 142) y CDR3 (LQYDDLWT, SEQ ID NO: 143).

10 **[0156]** Los anticuerpos o inmunoconjungados que comprenden un MAb anti-HLA-DR, como hL243 (IMMU-114), pueden usarse para tratar linfoma, leucemia, mieloma múltiple, cánceres de piel, esófago, estómago, colon, recto, páncreas, pulmón, mama, ovario, vejiga, endometrio, cuello uterino, testículos, riñón, hígado, melanoma u otros tumores productores de HLA-DR, como se describe en la Patente de EE. UU. n.º 7.612.180. Un anticuerpo hL243 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 144), CDR2 (WINTYTREPTYADDKG, SEQ ID NO: 145) y CDR3 (DITAVVPTGFDY, SEQ ID NO: 146) y CDR de cadena ligera secuencias CDR1 (RASENIYSNL, SEQ ID NO: 147), CDR2 (AASNLLAD, SEQ ID NO: 148) y CDR3 (QHFWTTPWA, SEQ ID NO: 149).

20 **[0157]** Los anticuerpos o inmunoconjungados que comprenden un MAb anti-CD20, como veltuzumab (hA20), 1F5, obinutuzumab (GA101) o rituximab, pueden usarse para tratar linfoma, leucemia, púrpura trombocitopénica inmune, 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 tipo I, GVHD o esclerosis múltiple, como se describe en las patentes EE. UU. números 7.435.803 o 8.287.864. Un anticuerpo hA20 (veltuzumab) es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDRL1 (RASSSVSYIH, SEQ ID NO: 150), CDRL2 (ATSNLAS, SEQ ID NO: 151) y CDRL3 (QQWTSNPPT, SEQ ID NO: 152) y pesado secuencias CDR de cadena CDRH1 (SYNMH, SEQ ID NO: 153), CDRH2 (AIYPGNGDTSYNQKFKG, SEQ ID NO: 154) y CDRH3 (STYYGGDWYFDV, SEQ ID NO: 155). Los anticuerpos o inmunoconjungados que comprenden un MAb anti-CD19, tal como hA19, pueden usarse para tratar linfomas y leucemias relacionados con células B, tales como linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica o leucemia linfoblástica aguda. Otros estados de enfermedad que pueden tratarse incluyen enfermedades autoinmunes, como trombocitopenia inmune aguda o 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 nudoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangiitis ubiterante, síndrome de Sjögren, primario cirrosis biliar, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, 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 EE. UU. números 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 CDR de cadena ligera CDR1 KASQSVYDGDSYLN (SEQ ID NO: 156); CDR2 DASNLVS (SEQ ID NO: 157); y CDR3 QQSTEDPWT (SEQ ID NO: 158) y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 SYWMN (SEQ ID NO: 159); CDR2 QIWPQGDGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 160) y CDR3 RETTTVGRYYAMDY (SEQ ID NO: 161). Los anticuerpos o inmunoconjungados que comprenden anticuerpos anti-tenascina pueden usarse para tratar tumores hematopoyéticos y sólidos, y los conjugados que comprenden anticuerpos contra tenascina pueden usarse para tratar tumores sólidos, preferiblemente cánceres cerebrales como glioblastomas.

55 **[0158]** En una forma de realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, los anticuerpos que se usan en el tratamiento de enfermedades humanas son versiones de anticuerpos humanos o humanizados (injertados con CDR), aunque se pueden usar versiones murinas y químéricas de anticuerpos. Se prefieren principalmente moléculas de IgG de la misma especie como agentes de suministro para minimizar las respuestas inmunitarias. Esto es particularmente importante cuando se consideran tratamientos repetidos. Para los seres humanos, es menos probable que un anticuerpo IgG humano o humanizado genere una respuesta inmunitaria anti-IgG en los pacientes. Los anticuerpos como hLL1 y hLL2 se internalizan rápidamente después de unirse al antígeno de internalización en las células diana, lo que significa que el fármaco transportado también se internaliza rápidamente en las células. Sin embargo, los anticuerpos que tienen velocidades de internalización más lentas también pueden usarse para efectuar una terapia selectiva.

60 **[0159]** Los anticuerpos o inmunoconjungados pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunes o disfunciones del sistema inmunitario (p. ej., enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órganos). Los

anticuerpos de uso para tratar la enfermedad de disfunción autoinmune/inmune pueden unirse a antígenos ejemplares que incluyen, entre otros, 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 y HLA-DR.

- 5 Los anticuerpos que se unen a estos y otros antígenos diana, discutidos anteriormente, pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunes o disfunciones inmunes. Las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse con anticuerpos o inmunoconjungados 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, Henoch-Púrpura de Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nodoso, arteritis de Takayasu, vasculitis asociadas a ANCA, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangiitis obliterante, síndrome de Sjogren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, 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.

[0160] En otra modalidad preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, un agente terapéutico usado en combinación con los inmunoconjungados puede comprender uno o más isótopos. Los isótopos radiactivos útiles para tratar tejidos enfermos incluyen, entre otros: ^{111}In , ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{9}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{227}Th y ^{211}Pb . El radionucleido terapéutico tiene preferiblemente una energía de desintegración en el rango de 20 a 6000 keV, preferiblemente en el rango de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2500 keV para un emisor beta y 4000-6000 keV para un emisor alfa. Las energías máximas de desintegración de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente de 20 a 5000 keV, más preferiblemente de 100 a 4000 keV y lo más preferiblemente de 500 a 2500 keV. También se prefieren los radionúclidos que se desintegran sustancialmente con partículas emisoras Auger. Por ejemplo, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m e Ir-192. Las energías de desintegración de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferentemente <1.000 keV, más preferentemente <100 keV y lo más preferentemente <70 keV. También se prefieren los radionúclidos que se desintegran sustancialmente con la generación de partículas alfa. Dichos radionucleidos incluyen, entre otros: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Th-227 y Fm-255. Las energías de desintegración de los radionucleidos emisores de partículas alfa útiles son preferentemente de 2000 a 10000 keV, más preferentemente de 3000 a 8000 keV y lo más preferentemente de 4000 a 7000 keV. Los radioisótopos potenciales adicionales de uso incluyen ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , ^{113m}In , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , ^{121m}Te , ^{122m}Te , ^{125m}Te , ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}TI , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb y similares.

[0161] Los radionúclidos y otros metales pueden administrarse, por ejemplo, utilizando grupos quelantes unidos a un anticuerpo o inmunoconjungado. Los quelatos macrocíclicos como NOTA, DOTA y TETA son útiles con una variedad de metales y radiometales, más particularmente con radionúclidos de galio, litio y cobre, respectivamente. Dichos complejos de quelato de metal se pueden hacer muy estables adaptando el tamaño del anillo al metal de interés. Se pueden usar otros quelatos de tipo anillo, tales como políteros macrocíclicos para complejar ^{223}Ra .

[0162] Los agentes terapéuticos de uso en combinación con los anticuerpos o inmunoconjungados descritos en este documento también incluyen, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos tales como alcaloides de la vinca, antraciclinas, epidifilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de tirosina quinasa de Bruton, inhibidores de microtúbulos, inhibidores de PARP, PI3K inhibidores, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de Cox-2, agentes antimitóticos, antiangiogénicos y proapoptóticos, particularmente doxorubicina, metotrexato, taxol, otras camptotecinas y otras de estas y otras clases de agentes anticancerígenos, y similares. Otros fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen mostazas nitrogenadas, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triacenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejos de coordinación de platino, hormonas y similares. Los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19^a ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en THE PARACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS DE GOODMAN Y GILMAN, 7^a ed. (MacMillan Publishing Co. 1985), así como ediciones revisadas de estas publicaciones. Otros agentes quimioterapéuticos adecuados, tales como fármacos experimentales, son conocidos por los expertos en la técnica.

[0163] Ejemplos de fármacos de uso incluyen, entre otros, 5-fluorouracilo, afatinib, aplidina, azaribina, anastrozol, antraciclinas, axitinib, AVL-101, AVL-291, bendamustina, bleomicina, bortezomib, bosutinib, briostatina-1, busulfán, caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, 10-hidroxicamptotecina, carmustina, celebrex, clorambucilo, cisplatino (CDDP), inhibidores de la Cox-2, irinotecán (CPT-11), SN-38, carboplatino, cladribina, camptoteca, crizotinib, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazine, dasatinib, dinaciclib, docetaxel, dactinomicina, daunorrubricina, doxorrubricina, 2-pirrolinodoxorrubricina (2PDOX), pro-2PDOX, ciano-morfolino doxorrubricina, doxorrubricina glucurónido, epirubricina glucurónido, erlotinib, estramustina, epidifilotoxina, 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 la farnesil-proteína transferasa, flavopiridol, fostamatinib, ganetespib, GDC-0834, GS- 1101, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, ibrutinib, idarubicin, idelalisib, ifosfamida, imatinib, L-asparaginasa, lapatinib, lenolidamida, leucovorin, LFM-A13, lomustina, mecloretamina, 5 melfalano, mercaptoperina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, navelbina, neratinib, nilotinib, nitrosurea, olaparib, plicamicina, procarbazina, paclitaxel, PCI-32765, pentostatina, PSI- 10 341, raloxifeno, semustina, sorafenib, estreptozocina, SU11248, sunitinib, tamoxifeno, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecan, uracilo mostaza, vatalanib, vinorelbina, vinblastina, vincristina, vinca alcaloides y ZD1839. Dichos agentes pueden ser parte de los conjugados descritos en el presente documento o, alternativamente, pueden administrarse en combinación con los conjugados descritos, ya sea antes, simultáneamente o después del conjugado. Alternativamente, se pueden usar uno o más anticuerpos desnudos terapéuticos como se conocen en la técnica en combinación con los conjugados descritos. Anteriormente se describen ejemplos de anticuerpos desnudos terapéuticos.

15 **[0164]** En formas de realización preferidas de la invención, como se define en las reivindicaciones, un agente terapéutico para usar en combinación con un conjugado de anticuerpo que rompe el ADN (p. ej., un SN-38-ADC) es un inhibidor de microtúbulos, como un alcaloide de la vinca, un taxano, un maitansinoide o una auristatina. Los ejemplos de inhibidores de microtúbulos conocidos incluyen paclitaxel, vincristina, vinblastina, mertansina, epotilona, 20 docetaxel, discodermolida, combrestatina, podofilotoxina, Cl-980, fenilahistinas, esteganacinas, curacinas, metoxiestradiol, E7010, metoxibencenosulfonamidas, vinorelbina, vinflunina, vindesina, dolastatinas, espongistatina, rizoxina, tasidotina, halicondrinas, hemiasterlinas, criptoficina 52, MMAE y mesilato de eribulina.

25 **[0165]** En una forma de realización preferida alternativa de la invención como se define en las reivindicaciones, un agente terapéutico que se utilizará en combinación con un ADC que rompe el ADN, como un conjugado de anticuerpo SN-38, es un inhibidor de PARP, como olaparib, talazoparib (BMN-673), rucaparib, veliparib, CEP 9722, MK 4827, BGB-290, ABT-888, AG014699, BSI-201, CEP-8983 o 3-aminobenzamida.

30 **[0166]** Alternativamente, un agente terapéutico usado en combinación con un anticuerpo o inmunoconjunto es un inhibidor de la quinasa de Bruton, como ibrutinib (PCI-32765), PCI-45292, CC-292 (AVL-292), ONO-4059, GDC-0834, LFM-A13 o RN486.

35 **[0167]** En otra alternativa más, un agente terapéutico utilizado en combinación con un anticuerpo o inmunoconjunto es un inhibidor de PI3K, como idelalisib, Wortmannin, demethoxyviridin, perifosine, PX-866, IPI-145 (duvelisib), BAY 80-6946, BEZ235, RP6530, TGR1202, SF1126, INK1117, GDC-0941, BKM120, XL147, XL765, Palomid 529, GSK1059615, ZSTK474, PWT33597, IC87114, TG100-115, CAL263, PI-103, GNE477, CUDC-907, A EZS-136 o LY294002.

40 **[0168]** Los agentes terapéuticos que pueden usarse en la práctica de la invención como se define en las reivindicaciones junto con los anticuerpos o inmunoconjuntos también pueden comprender toxinas conjugadas con 45 restos de direccionamiento. Las toxinas que pueden usarse a este respecto incluyen ricina, abrina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*. (Véase, por ejemplo, Pastan. et al., Cell (1986), 47:641, y Sharkey y Goldenberg, CA Cancer J Clin. 2006 Jul-Ago;56(4):226-43.) Toxinas adicionales adecuadas para su uso en este documento son conocidas por los expertos en la técnica y se describen en el documento US 6.077.499.

45 **[0169]** Otra clase más de agente terapéutico puede comprender uno o más inmunomoduladores. Los inmunomoduladores de uso pueden seleccionarse de una citocina, un factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF), un interferón (IFN), eritropoyetina, 50 trombopoyetina y una combinación de los mismos. Específicamente útiles son las linfoxinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), los factores hematopoyéticos, como la interleucina (IL), el factor estimulante de colonias, como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón, como los interferones- α , - β , - γ o - λ , y factor de crecimiento de células madre, como el denominado "factor S1". Entre las citoquinas se incluyen hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana N-metionil y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteína tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor de necrosis tumoral- α y - β ; sustancia inhibidora de Müller; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento tipo insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón- α , - β y - γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófagos CSF (M-CSF); interleucinas (IL) como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, kit-ligando o FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, necrosis tumoral 60 factor y linfoxina (LT). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes 65

naturales o de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

5 [0170] Las quimioquinas de uso incluyen RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-Beta e IP-10.

10 [0171] El experto en la materia se dará cuenta de que el uso de los inmunoconjungados y fármacos objeto de acuerdo con la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, puede abarcar además el uso de uno o más agentes terapéuticos, como un segundo anticuerpo, un segundo fragmento de anticuerpo, un segundo inmunoconjungado, radionúclido, toxina, fármaco, agente quimioterapéutico, radioterapia, quimiocina, citocina, inmunomodulador, enzima, hormona, oligonucleótido, RNAi o siARN. Preferiblemente, el agente terapéutico es un inhibidor de PARP, un inhibidor de microtúbulos, un inhibidor de quinasa de Bruton o un inhibidor de PI3K. Los ejemplos de inhibidores de PARP conocidos incluyen olaparib, talazoparib (BMN-673), rucaparib, veliparib, CEP 9722, MK 4827, BGB-290, ABT-888, AG014699, BSI-201, CEP-8983 o 3-aminobenzamida. Los ejemplos de inhibidores de microtúbulos conocidos incluyen, pero no se limitan a, alcaloide de la vinca, taxanos, maitansinoides, auristatinas, paclitaxel, vincristina, vinblastina, mertansina, epotilona, docetaxel, discodermolida, combrestatina, podofilotoxina, C1-980, fenilahistinas, esteganacinas, curacinas, 2-metoxiestradiol, E7010, metoxibencenosulfonamidas, vinorelbina, vinflunina, vindesina, dolastatinas, espongistatina, rizoxina, tasidotina, halicondrinas, hemiasterlinas, criptoficina 52, MMAE y mesilato de eribulina. Los ejemplos de inhibidores de la quinasa Bruton incluyen ibrutinib (PCI-32765), PCI-45292, CC-292 (AVL-292), ONO-4059, GDC-0834, LFM-A13 o RN486. Los inhibidores ejemplares de PI3K incluyen 25 idelalisib, Wortmannin, demetoxiviridina, perifosina, PX-866, IPI-145 (duvelisib), BAY 80-6946, BEZ235, RP6530, TGR1202, SF1126, INK1117, GDC-0941, BKM120, XL147, XL765, Palomid 529, GSK1059615, ZSTK474, PWT33597, IC87114, TG100-115, CAL263, PI-103, GNE477, CUDC-907, AEZS-136 o LY294002. Dichos agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse por separado, en combinación o unidos a los anticuerpos o inmunoconjungados en cuestión.

25 Formulación y administración

30 [0172] Las rutas adecuadas de administración de los anticuerpos, inmunoconjungados y/o fármacos incluyen, sin limitación, inyecciones parenterales, subcutáneas, rectales, transmucosas, intestinales, intramusculares, intramedulares, intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intravítreas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares. Las vías de administración preferidas son las parenterales. Alternativamente, se puede administrar el compuesto de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección del compuesto directamente en un tumor sólido. Ciertos fármacos, como los inhibidores de microtúbulos, los inhibidores de PARP, los inhibidores de la quinasa de Bruton o los inhibidores de PI3K pueden diseñarse para administrarse por vía oral.

35 [0173] Los anticuerpos o inmunoconjungados se pueden formular según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en las que el anticuerpo o inmunoconjungado se combina en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un excipiente farmacéuticamente adecuado. Otros excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la 40 técnica. Ver, por ejemplo, Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5^a Edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18^a Edición (Mack Publishing Company 1990), y ediciones revisadas del mismo.

45 [0174] En una forma de realización preferida, el anticuerpo o inmunoconjungado se formula en tampón biológico de Good (pH 6-7), usando 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)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES); ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES); ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS); ácido 3-(N-morfolinil)-2-hidroxipropanosulfónico (MOPSO); y ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico) [Pipas]. Los tampones más preferidos son MES o MOPS, preferiblemente en el rango de concentración de 20 a 100 mM, más preferiblemente alrededor de 25 mM. El más preferido es MES 25 mM, pH 6,5. La formulación puede comprender además trehalosa 50 25 mM y polisorbato 80 al 0,01% v/v como excipientes, con la concentración final de tampón modificada a 22,25 mM como resultado de los excipientes añadidos. El método preferido de almacenamiento es como una formulación liofilizada de los conjugados, almacenados en el rango de temperatura de -20 °C a 2 °C, siendo el almacenamiento 55 más preferido de 2 °C a 8 °C.

60 [0175] El anticuerpo o inmunoconjungado se puede formular para administración intravenosa mediante, por ejemplo, inyección en bolo, infusión lenta o infusión continua. Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención se infunde durante un período de menos de aproximadamente 4 horas, y más preferiblemente, durante un período de menos de aproximadamente 3 horas. Por ejemplo, los primeros 25 a 50 mg podrían infundirse en 30 minutos, preferiblemente incluso 15 minutos, y el resto infundirse durante las siguientes 2 a 3 horas. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o

dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

[0176] Pueden emplearse métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción del conjugado terapéutico. Las preparaciones de liberación controlada se pueden preparar mediante el uso de polímeros para complejar o adsorber el inmunoconjungado. 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 sebálico. Sherwood y col., *Bio/Technology* 10: 1446 (1992). La tasa de liberación de un anticuerpo o inmunoconjungado de dicha matriz depende del peso molecular, la cantidad de anticuerpo o inmunoconjungado dentro de la matriz y el tamaño de las partículas dispersas. Saltzman y col., *Biophys. J.* 55: 163 (1989); Sherwood y col., *supra*. Otras formas de dosificación sólidas se describen en Ansel et al., *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS*, 5^a Edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 18^a Edición (Mack Publishing Company 1990), y ediciones revisadas de los mismos.

[0177] Generalmente, la dosificación de un anticuerpo o inmunoconjungado administrado para humanos variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, el estado médico general y el historial médico previo del paciente. Puede ser deseable proporcionar al receptor una dosis de inmunoconjungado que esté en el rango de aproximadamente 1 mg/kg a 24 mg/kg como una infusión intravenosa única, aunque también se puede administrar una dosis más baja o más alta según lo dicten las circunstancias. Una dosis de 1 a 20 mg/kg para un paciente de 70 kg, por ejemplo, es de 70 a 1400 mg o de 41 a 824 mg/m² para un paciente de 1,7 m. La dosis puede repetirse según sea necesario, por ejemplo, una vez por semana durante 4 a 10 semanas, una vez por semana durante 8 semanas o una vez por semana durante 4 semanas. También se puede administrar con menos frecuencia, 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, entre otras, 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 y 18 mg/kg. La dosificación se administra preferiblemente múltiples veces, una o dos veces por semana, o con una frecuencia tan baja como una vez cada 3 o 4 semanas. Se puede usar un programa de dosificación mínimo de 4 semanas, más preferiblemente de 8 semanas, más preferiblemente de 16 semanas o más. El programa de administración puede comprender la administración una o dos veces por semana, en un ciclo seleccionado del grupo que consiste en: (i) semanal; (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; (viii) mensual y (ix) cada 3 semanas. El ciclo puede repetirse 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 o 20 veces o más.

[0178] Alternativamente, un anticuerpo o inmunoconjungado puede administrarse como una dosis cada 2 o 3 semanas, repetida para un total de al menos 3 dosis. O bien, dos veces por semana durante 4-6 semanas. Si la dosis se reduce a aproximadamente 200-300 mg/m² (340 mg por dosis para un paciente de 1,7 m o 4,9 mg/kg para un paciente de 70 kg), se puede administrar una o incluso dos veces por semana durante 4 a 10 semanas. Alternativamente, el programa de dosificación puede reducirse, es decir, cada 2 o 3 semanas durante 2-3 meses. Sin embargo, se ha determinado que incluso dosis más altas, como 12 mg/kg una vez a la semana o una vez cada 2-3 semanas, pueden administrarse mediante infusión intravenosa lenta, para ciclos de dosificación repetidos. El programa de dosificación puede repetirse opcionalmente en otros intervalos y la dosificación puede administrarse a través de varias vías parenterales, con el ajuste apropiado de la dosis y el programa.

[0179] Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse de acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma y leucemia, mieloma o neoplasias malignas linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres se indican a continuación e incluyen: cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer epitelial de células escamosas), sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, astrocitomas, glioblastomas, cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer gástrico o de estómago, incluido el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, carcinoma hepatocelular, tumores neuroendocrinos, cáncer medular de tiroides, carcinoma diferenciado de tiroides, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello. El término "cáncer" incluye células o tumores malignos primarios (p. ej., aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto que no sean el sitio del tumor o malignidad original) y células o tumores malignos secundarios (p. ej., aquellos que surgen de la metástasis, la migración de células malignas o células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

[0180] Otros ejemplos de cánceres o neoplasias malignas incluyen, entre otros: leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cáncer hepatocelular (primario) en adultos, cáncer de hígado (primario) en adultos, Leucemia linfocítica, 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 tejido blando en adultos, linfoma relacionado con el SIDA, neoplasias malignas relacionadas con el SIDA, cáncer anal, astrocitoma, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, glioma de tronco encefálico, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de pelvis renal y uréter, 5 linfoma del sistema nervioso central (primario), linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer de cuello uterino infantil (primario). Cáncer hepatocelular, cáncer de hígado (primario) infantil, leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma de tronco encefálico infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores extracraneales de células germinales infantiles, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin infantil, hipotalámico infantil y glioma de la 10 vía visual, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no Hodgkin infantil, tumores neuroectodérmicos primitivos pineales y supratentoriales infantiles, cáncer de hígado primario infantil, rabdomiosarcoma infantil, sarcoma de tejido blando infantil, glioma hipotalámico y de la vía visual infantil, leucemia linfocítica crónica, Leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, carcinoma de células de los islotes pancreáticos endocrinos, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, cáncer de esófago, 15 sarcoma de Ewing y tumores relacionados, cáncer de páncreas exocrino, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, Cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, cáncer de mama femenino, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores gastrointestinales, tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin, hipergammaglobulinemia, cáncer de 20 hipofaringe, cánceres intestinales, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, cáncer de páncreas de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, trastornos linfoproliferativos, macroglobulinemia, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso 25 primario oculto metastásico, cáncer de cuello escamoso primario metastásico, cáncer de cuello escamoso metastásico, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal y senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, metástasis primaria oculta Cáncer de cuello escamoso, cáncer de orofaringe, osteosarcoma/sarcoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno del hueso, 30 cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, paraproteinemias, policitemia vera, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor hipofisario, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer primario de hígado, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándulas 35 salivales, sarcoidosis sarcomas, Sezary cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago, tumores neuroectodérmicos y pineales supratentoriales primitivos, linfoma de células T, cáncer testicular, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición del Pelvis renal y uréter, transición de pelvis renal y cáncer de uréter, tumores trofoblásticos, cáncer de células de uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma de útero, cáncer de vagina, glioma hipotalámico y de la vía visual, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms, y 40 cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de la neoplasia, localizada en un sistema de órganos mencionado anteriormente.

[0181] La invención, tal como se define en las reivindicaciones, puede usarse para tratar afecciones malignas o premalignas y para prevenir la progresión a un estado neoplásico o maligno, incluidos, entre otros, los trastornos descritos anteriormente. Dichos usos están indicados en condiciones conocidas o sospechosas de progresión previa a neoplasia o cáncer, en particular, donde se ha producido un crecimiento celular no neoplásico consistente en hiperplasia, metaplasia o, más particularmente, displasia (para una revisión de tales condiciones de crecimiento anormal, ver Robbins y Angell, Basic Pathology, 2.^a edición, WB Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-79 (1976)).

[0182] La displasia es frecuentemente un precursor del cáncer y se encuentra principalmente en el epitelio. Es la forma más desordenada de crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida en la uniformidad de las células individuales y en la orientación arquitectónica de las células. La displasia ocurre característicamente cuando existe irritación o inflamación crónica. Los trastornos displásicos que se pueden tratar incluyen, entre otros, displasia ectodérmica anhidrótica, displasia anterofacial, displasia torácica asfixiante, displasia atriodigital, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia cervical, displasia condroectodérmica, displasia cleidocraneal, displasia ectodérmica congénita, displasia craneodiasfaria, displasia craneocarpotarsiana, displasia craneometafisaria, displasia de dentina, displasia diafisaria, displasia ectodérmica, displasia del esmalte, displasia encefaloftálmica, displasia epifisaria hemimelia, displasia epifisaria múltiple, displasia epifisaria punctata, displasia epitelial, displasia faciodigitogenital, displasia fibrosa familiar de los maxilares, displasia plegada blanca familiar, displasia fibromuscular, 50 displasia fibrosa del hueso, displasia ósea florida, displasia renal-retiniana hereditaria, displasia ectodérmica hidrótica, displasia ectodérmica hipohidrótica, displasia tímica linfopénica, displasia mamaria, displasia mandibulofacial, displasia metafisaria, displasia de Mondini, displasia fibrosa monostótica, displasia mucoepitelial, displasia epifisaria múltiple, displasia oculoauriculovertebral, displasia oculodentodigital, displasia oculovertebral, displasia odontogénica, displasia oftalmomandibulomélica, displasia cementosa periapical, displasia fibrosa poliostótica, displasia 55

espondiloepifisaria pseudoacondroplásica, displasia retiniana, displasia septoóptica, displasia espondiloepifisaria y displasia ventricularadial.

5 [0183] Los trastornos preneoplásicos adicionales que se pueden tratar incluyen, entre otros, trastornos disprólios y/o displasias benignos (p. ej., tumores benignos, afecciones fibroquísticas, hipertrofia tisular, pólipos o adenomas intestinales y displasia esofágica), leucoplasia, queratosis, enfermedad de Bowen, piel de Farmer, queilitis solar y queratosis solar.

10 [0184] En formas de realización preferidas, la invención tal como se define en las reivindicaciones se usa para inhibir el crecimiento, la progresión y/o la metástasis de cánceres, en particular los enumerados anteriormente.

15 [0185] Otras enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas incluyen, entre otros, progresión y/o metástasis de tumores malignos y trastornos relacionados, como la leucemia (incluidas las leucemias agudas; p. ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda [incluidas las mieloblásticas, 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 cadena pesada y tumores sólidos que incluyen, entre otros, sarcomas y carcinomas como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, células renales carcinoma, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, emangioblastoma, neuroma acústico, oligodendrogioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

20 [0186] Las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse con anticuerpos o inmunoconjungados 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 nodoso, arteritis de Takayasu, vasculitis asociada con ANCA, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangiitis obliterante, síndrome de Sjogren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia crónica hepatitis activa, 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.

40 Kits

45 [0187] La presente divulgación también se refiere a kits que contienen componentes adecuados para tratar tejido enfermo en un paciente. Los kits de ejemplo pueden contener al menos un anticuerpo o inmunoconjungado como se describe en este documento. Un kit también puede incluir un fármaco seleccionado entre inhibidores de microtúbulos, inhibidores de PARP, inhibidores de quinasa de Bruton y/o inhibidores de PI3K. Si la composición que contiene los componentes para la administración no está formulada para la administración a través del canal alimentario, como la administración oral, se puede incluir un dispositivo capaz de administrar los componentes del kit a través de alguna otra ruta. Un tipo de dispositivo, para aplicaciones como la administración parenteral, es una jeringa que se usa para inyectar la composición en el cuerpo de un sujeto. También se pueden usar dispositivos de inhalación.

50 [0188] Los componentes del kit pueden empaquetarse juntos o separarse en dos o más contenedores. En algunas formas de realización, los recipientes pueden ser viales que contienen formulaciones liofilizadas estériles de una composición que es adecuada para la reconstitución. Un kit también puede contener uno o más tampones adecuados para la reconstitución y/o dilución de otros reactivos. Otros recipientes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, una bolsa, bandeja, caja, tubo o similar. Los componentes del kit pueden empaquetarse y mantenerse estériles dentro de los contenedores. Otro componente que se puede incluir son las instrucciones para una persona que utilice un kit para su uso.

60 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Terapia combinada con ADC IMMU-132 e inhibidores de microtúbulos o inhibidores de PARP

65 [0189] En los ensayos clínicos actuales (ClinicalTrials.gov, NCT01631552), los pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) tratados con IMMU-132, que está compuesto por el metabolito activo del irinotecán, SN-38,

conjugado con un anticuerpo anti-Trop-2, muestra una toxicidad manejable y respuestas muy alentadoras en casos recidivantes/refractarios.

5 **[0190]** La letalidad sintética es un concepto en el que una célula que alberga uno de dos posibles defectos genéticos o proteicos es viable, mientras que una célula que contiene ambos defectos es inviable. Las mutaciones *BRCA1/2* están vinculadas a deficiencias en la reparación del ADN y están asociadas con TNBC. Otros mecanismos de reparación implican la poli(adenosina difosforribosa) polimerasa (PARP), que las células cancerosas pueden utilizar para superar la pérdida de *BRCA1/2*. El tratamiento de las células TNBC con IMMU-132 o paclitaxel da como resultado la escisión y desactivación de PARP, mientras que la molécula pequeña de olaparib inhibe directamente la PARP. Por lo tanto, se investigó el fundamento de la combinación de IMMU-132 con paclitaxel u olaparib para eliminar de forma efectiva la actividad de PARP en xenoinjertos de TNBC para determinar si estas combinaciones resultarán en letalidad sintética.

10 **[0191]** El propósito de este estudio fue determinar si la combinación de un conjugado de anticuerpo y fármaco que induce roturas de cadenas de ADN, como sacituzumab govitecan (también conocido como IMMU-132, un anti-Trop-2 hRS7-CL2A-SN-38), con microtúbulos inhibidores (p. ej., paclitaxel o mesilato de eribulina) o inhibidores de la poli(adenosina difosforribosa) polimerasa (PARP) (p. ej., olaparib) en el cáncer (p. ej., ratones desnudos portadores de xenoinjertos de TNBC) mejora los efectos antitumorales. El experto en la materia se dará cuenta de que los efectos superiores inesperados de la combinación de conjugados de anticuerpo-SN-38 con PARP o inhibidores de microtúbulos no se limitan al anticuerpo, fármaco, inhibidor de PARP o inhibidor de microtúbulos ejemplares específicos, sino que son característicos de las clases de anticuerpos contra antígenos asociados a tumores (TAA), fármacos que inducen roturas de cadenas de ADN, inhibidores de PARP e inhibidores de microtúbulos.

25 *Procedimientos experimentales*

30 **[0192]** En un ejemplo no limitativo, ratones portadores de xenoinjertos humanos de TNBC (cáncer de mama triple negativo) (MDA-MB-468 o HCC1806; ~0,3 cm³) se trataron con la dosis máxima tolerada de paclitaxel (15 mg/kg semanales x 5 semanas). e IMMU-132 a 10 mg/kg o 12,5 mg/kg los días 1, 8, 22 y 29. Se trataron ratones con tumores HCC1806 (~0,28 cm³) durante 2 ciclos con IMMU-132 (12,5 mg/kg) y 0,5 mg/kg de mesilato de eribulina (equivalente a la dosis humana de 1,4 mg/m²) semanalmente durante 2 semanas en un ciclo de 21 días. Los estudios que examinaron la inhibición de PARP utilizaron ratones con tumores MDA-MB-468 (~0,32 cm³) tratados con olaparib (50 mg/kg, qdx5d, x 4 semanas; 33 % de la dosis humana equivalente a 800 mg diarios) e IMMU-132 (10 mg/kg, dos veces por semana x 4 semanas). Olaparib se administró como inyecciones i.p. diariamente durante 5 días seguidos con dos días de descanso antes de repetir (qdx5). Esto se hizo durante cuatro semanas. IMMU-132 se administró i.p. dos veces por semana durante cuatro semanas. Los animales de control recibieron el anti-CD20 ADC hA20-CL2A-SN-38 no dirigido a tumores, ya sea solo o en combinación con olaparib. El criterio principal de valoración fue la mediana del tiempo de supervivencia (MST), definido como el tiempo que tardan los tumores en progresar hasta 1,0 cm³.

40 **[0193]** En formas de realización alternativas, el ensayo de efectos sinérgicos puede determinarse mediante ensayo *in vitro*. Puede usarse un ensayo clonogénico para determinar la fracción de supervivencia de las células (Ibrahim et al., 2012, *Cancer Discovery* 2:1036-47). Brevemente, se sembraron 350-800 células en placas de cultivo celular de fondo plano de 6 pocillos por duplicado. Veinticuatro horas después de la siembra, las células se lavan y se agrega medio fresco en presencia o ausencia de dosis crecientes de ADC y/o PARP o inhibidor de microtúbulos (p. ej., olaparib) solos o en combinación. Los medios que contienen el fármaco y/o se actualizan el día 4. Las colonias se fijan y tiñen después de 7 días de tratamiento con 1,5 ml de glutaraldehído al 6,0 % y cristal violeta al 0,5 % y las colonias se cuentan mediante procedimientos estándar. La fracción sobreviviente (SF) de las células se calcula de la siguiente manera:

$$50 \quad SF = \frac{\text{Número de colonias formadas después del tratamiento}}{\text{Número de células sembradas x eficiencia de sembrado}}$$

$$55 \quad \text{Eficiencia de sembrado} = \frac{\text{Número de colonias formadas en control}}{\text{Número de células sembradas}}$$

donde

60 **[0194]** La interacción entre ADC y PARP o inhibidor de microtúbulos se evalúa utilizando el método de análisis de efectos de fármacos múltiples de Chou y Talalay (1984, *Adv Enzyme Regul* 22:27-55). Este método describe cuantitativamente la interacción entre dos o más fármacos, donde los valores inferiores a 1 indican interacciones sinérgicas, los valores superiores a 1 indican interacciones antagónicas y los valores iguales a 1 indican interacciones aditivas.

Resultados

[0195] Los ratones con tumores MDA-MB-468 que recibieron la combinación de IMMU-132 y paclitaxel exhibieron efectos antitumorales superiores (FIG. 1A-1C), con una reducción del tumor de >11 veces, en comparación con una reducción de 1,4 veces en la IMMU- 132 solo ($P=0,0003$; área bajo la curva, AUC) o aumento de 11,4 veces en el tamaño del tumor en ratones tratados con paclitaxel solo ($P<0,0001$; AUC).

[0196] En MDA-MB-468, la combinación de 200 μ g de IMMU-132 más paclitaxel tiene efectos antitumorales superiores en términos de área bajo la curva (AUC) en comparación con todos los demás grupos (Tabla 7, $P<0,0013$). Reducir la cantidad de IMMU-132 administrada con paclitaxel a 100 mg también da como resultado efectos antitumorales significativos en comparación con ratones tratados con paclitaxel solo, IMMU-132 solo (100 mg) o animales no tratados (Tabla 8, $P<0,0328$). No se pueden realizar más comparaciones entre las curvas de crecimiento con paclitaxel o grupos de control no tratados, ya que cada uno comenzó a perder ratones debido a la progresión de la enfermedad (es decir, $TV>1,0 \text{ cm}^3$) a partir del día 49 de la terapia.

Tabla 7. Comparaciones del área bajo la curva entre ratones portadores de tumores MDA-MB-468 tratados con IMMU-132 (200 μ g) más paclitaxel y todos los demás grupos de tratamiento.

Tratamientos	Tiempo de comparación	Volúmenes tumorales (cm^3) en ese día (media \pm d.e.)	Valor P (AUC)
IMMU-132 (200 μ g) más Paclitaxel frente a	IMMU-132 (200 μ g)	$0,162 \pm 0,144$ frente a $0,621 \pm 0,324$	0,0003
	IMMU-132 (100 μ g)	$0,050 \pm 0,062$ frente a $0,634 \pm 0,335$	0,0002
	Paclitaxel	$0,025 \pm 0,041$ frente a $0,705 \pm 0,206$	<0,0001
	IMMU-132 (100 μ g) + Paclitaxel	$0,202 \pm 0,191$ frente a $0,496 \pm 0,286$	0,0013
	Sin tratar	$0,025 \pm 0,041$ frente a $0,663 \pm 0,349$	<0,0001

Tabla 8. Comparaciones del área bajo la curva entre ratones portadores de tumores MDA-MB-468 tratados con IMMU-132 (100 μ g) más paclitaxel y todos los demás grupos de tratamiento.

Tratamientos	Tiempo de comparación	Volúmenes tumorales (cm^3) en ese día (media \pm d.e.)	Valor P (AUC)
IMMU-132 (100 μ g) más Paclitaxel frente a	IMMU-132 (200 μ g)	$0,663 \pm 0,349$ frente a $0,621 \pm 0,324$	0,9539
	IMMU-132 (100 μ g)	$0,311 \pm 0,196$ frente a $0,634 \pm 0,335$	0,0328
	Paclitaxel	$0,211 \pm 0,155$ frente a $0,705 \pm 0,206$	<0,0001
	Sin tratar	$0,211 \pm 0,155$ frente a $0,663 \pm 0,349$	0,0001

[0197] En los xenoinjertos de HCC1806 de rápido progreso (FIG. 2A-2B), la combinación de IMMU-132 más paclitaxel demostró tener un efecto antitumoral superior en comparación con la monoterapia con IMMU-132 ($P = 0,0195$, $AUC_{17 \text{ días}}$). Este es un tumor muy agresivo con un tiempo medio de supervivencia (MST) de solo 10 días después del inicio de la terapia para los animales de control no tratados (18 días después de la inoculación de células tumorales). En términos de supervivencia, la combinación, que alcanzó su MST de 38 días, proporcionó un beneficio de supervivencia significativo en comparación con todas las demás terapias ($P < 0,017$; rango logarítmico). Cabe señalar que esto se logró con una dosis baja de solo 0,25 mg, que sería la dosis equivalente en humanos de solo 1 mg/kg.

[0198] Los ratones tratados con la combinación de IMMU-132 más mesilato de eribulina (FIG. 3A-3E) mostraron una respuesta antitumoral significativamente mayor que todos los demás grupos de monoterapia ($P < 0,0432$; prueba t pareada). Esto resultó en un beneficio de supervivencia significativo para la combinación (MST = 23 días) en comparación con la monoterapia con eribulina o IMMU-132 (MST = 18 y 14 días, respectivamente; $P < 0,0044$; rango logarítmico).

[0199] Asimismo, la combinación de la terapia IMMU-132 con olaparib fue superior a la terapia con un solo agente en ratones que tenían tumores MDA-MB-468 ($P<0,0032$; AUC) (FIG. 4). Los resultados se resumen en la Tabla 9. Todos los tratamientos combinados con IMMU-132 fueron bien tolerados.

5 **Tabla 9. Comparaciones del área bajo la curva entre ratones portadores de tumores MDA-MB-468 tratados con IMMU-132 más Olaparib y todos los demás grupos de tratamiento.**

Tratamientos	Tiempo de comparación	Volumenes tumorales (cm ³) en ese día (media ± d.e.)	Valor P (AUC)
IMMU-132 más Olaparib frente a	IMMU-132 solo	0,030 ± 0,038 frente a 0,088 ± 0,069	0,0023
	hA20-SN-38 más Olaparib	0,030 ± 0,038 frente a 0,652 ± 0,306	<0,0001
	hA20-SN-38 solo	0,045 ± 0,045 frente a 0,654 ± 0,285	0,0002
	Olaparib solo	0,083 ± 0,050 frente a 0,649 ± 0,267	<0,0001
	Salina	0,083 ± 0,050 frente a 0,697 ± 0,352	<0,0001

10 [0200] Determinación de la relación fármaco-anticuerpo (DAR). Se evaluaron cinco lotes clínicos de IMMU-132 mediante HPLC de interacción hidrofóbica (HIC-HPLC), que resolvió tres picos que representan especies con DAR de 6, 7 y 8, con la mayor fracción que comprende un DAR = 8 (no se muestra). IMMU-132 se produjo consistentemente mediante este proceso de fabricación, con un DAR (PAR AVE) general de 7,60 ± 0,03 entre los cinco lotes clínicos. Los resultados de HIC-HPLC se confirmaron mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). El análisis mostró que >99 % de los 8 grupos sulfhidrilo disponibles se acoplaron con el enlazador CL2A, con o sin SN-38 (no se muestra). No se detectaron cadenas pesadas o ligeras no sustituidas (o cubiertas con N-etilmaleimida). Por lo tanto, la diferencia en DAR entre las especies resulta de la liberación de SN-38 del enlazador durante la fabricación y no de una relación de sustitución inicial más baja. Una vez preparado y liofilizado, IMMU-132 se ha mantenido estable durante varios años.

15 [0201] Efecto de DAR sobre la farmacocinética y la eficacia antitumoral en ratones. Los ratones que portaban xenoinjertos de carcinoma gástrico humano Trop-2⁺ (NCI-N87) recibieron 2 tratamientos con 7 días de diferencia, cada uno con dosis iguales de proteína (0,5 mg) de IMMU-132 con DAR de 6,89, 3,28 o 1,64. Los animales tratados con ADC que tenían un DAR de 6,89 tuvieron una mediana de tiempo de supervivencia (MST) significativamente mejorada en comparación con los ratones que recibieron ADC con DAR de 3,38 o 1,64 (MST = 39 días frente a 25 y 21 días, respectivamente; P <0,0014) (no mostrada). No hubo diferencia entre los grupos tratados con los conjugados 3,28 o 1,64 DAR y el grupo de control con solución salina.

20 [0202] Para dilucidar aún más la importancia de una DAR más alta, a los ratones que tenían tumores gástricos NCI-N87 se les administró 0,5 mg de IMMU-132 con una DAR de 6,89 dos veces por semana durante dos semanas (no se muestra). Otro grupo recibió el doble de la dosis de proteína (1 mg) de un conjugado IMMU-132 con un DAR de 3,28. Aunque ambos grupos recibieron la misma cantidad total de SN-38 (36 mg) con cada esquema de dosificación, los tratados con el conjugado DAR 6,89 inhibieron el crecimiento tumoral significativamente más que los animales con tumores tratados con el conjugado DAR 3,28 (P = 0,0227; AUC) (no se muestra). Además, el tratamiento con el DAR más bajo no fue significativamente diferente de los controles sin tratar. En conjunto, estos estudios indican que una DAR más baja reduce la eficacia.

25 [0203] Se realizó un examen del comportamiento farmacocinético de los conjugados preparados en estas diferentes proporciones en ratones sin tumor que recibieron 0,2 mg de cada conjugado, hRS7 IgG no conjugado o hRS7 IgG que se redujo y luego se tapó con N-etilmaleimida. Se tomó suero a 5 intervalos de 0,5 a 168 h y se analizó por ELISA para hRS7 IgG. No hubo diferencia significativa en la eliminación de estos conjugados en comparación con la IgG no conjugada (no se muestra). Por lo tanto, el nivel de sustitución no afectó a la farmacocinética de los conjugados e, igualmente importante, la reducción de los enlaces disulfuro entre cadenas no pareció desestabilizar el anticuerpo.

30 [0204] Mecanismo de acción de IMMU-132 en TNBC. La vía apoptótica utilizada por IMMU-132 se examinó en la línea celular TNBC, MDA-MB-468, y en la línea celular HER2⁺ SK-BR-3, para confirmar que el ADC funciona sobre la base de su SN-38 incorporado. Las células se expusieron a SN-38 1 µM, el equivalente de SN-38 de IMMU-132 o el equivalente proteico de hRS7. Se recogieron las células y se realizaron transferencias de Western. SN-38 solo y mediada por IMMU-132 >2 veces la regulación positiva de p21^{WAF1/Cip1} dentro de las 24 h en MDA-MB-468, y a las 48 h, la cantidad de p21^{WAF1/Cip1} en estas células comenzó a disminuir (31 % y 43 % con SN-38 o IMMU-132, respectivamente) (no se muestra). Curiosamente, en la línea tumoral HER2⁺ SKBR-3, ni SN-38 ni IMMU-132 mediaron la regulación positiva de p21^{WAF1/Cip1} por encima de los niveles constitutivos en las primeras 24 h, pero como se observa en las células MDA-MB-468 después Exposición de 48 h a SN-38 o IMMU-132, la cantidad de p21^{WAF1/Cip1} disminuyó >57 % (no se muestra). Tanto SN-38 como IMMU-132 dieron como resultado la escisión de pro-caspasa-3 en sus fragmentos activos dentro de las 24 h, pero se observó el mayor grado de fragmentos activos después de la exposición durante 48 h. Es de destacar que en ambas líneas celulares, IMMU-132 medió un mayor grado de escisión de pro-caspasa-3, con el nivel más alto observado después de 48 h en comparación con las células expuestas a SN-38 (no

se muestra). Finalmente, tanto SN-38 como IMMU-132 mediaron la escisión de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP), comenzando a las 24 h, con una escisión casi completa después de 48 h (no se muestra). En conjunto, estos resultados confirman que IMMU-132 tiene un mecanismo de acción similar al de SN-38 libre cuando se administra *in vitro*.

5 **[0205]** Entrega de SN-38 por IMMU-132 frente a irinotecán en un modelo de xenoinjerto de tumor humano. Los productos constitutivos derivados del irinotecán o IMMU-132 se determinaron en el suero y los tumores de ratones implantados s.c. con un xenoinjerto de cáncer de páncreas humano (Capan-1) al que se administró irinotecán (773 mg; equivalentes de SN-38 = 448 mg) e IMMU- 132 (1,0 mg; SN-38 equivalentes = 16 mg). Después de la administración, en 5 intervalos, 3 animales de cada grupo fueron sacrificados con suero extraído para los productos de interés.

10 **[0206]** El irinotecán se eliminó muy rápidamente del suero y se observó conversión a SN-38 y SN-38G en 5 minutos (no se muestra). Ninguno de los productos fue detectado a las 24 h. Las AUC durante un período de 6 horas fueron 21,0, 2,5 y 2,8 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{h}$ para irinotecán, SN-38 y SN-38G, respectivamente (conversión de SN-38 en ratones = [2,5 + 2,8]/21 = 25,2%). Los animales que recibieron IMMU-132 tenían concentraciones mucho más bajas de SN-38 libre en el suero, pero se detectó a las 48 h (no se muestra). El SN-38G libre se detectó solo a las 1 y 6 horas, y fue de 3 a 7 veces más bajo que el SN-38 libre (no mostrado).

15 **[0207]** En los tumores Capan-1 extirpados de animales tratados con irinotecán, los niveles de irinotecán fueron altos durante 6 h, pero indetectables a las 24 h (AUC 5min-6 h = 48,4 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$). SN-38 fue mucho menor y se detectó solo durante 2 h (es decir, AUC 5min-2 h = 0,4 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$), con valores de SN-38G casi 3 veces más altos (AUC = 1,1 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$) (no mostrada). Los tumores tomados de animales que recibieron IMMU-132 no tenían ningún SN-38 o SN-38G libre detectable, sino que todo el SN-38 en el tumor estaba unido a IMMU-132. Es importante destacar que, dado que no se detectó SN-38G en los tumores, esto sugiere que SN-38 unido a IMMU-132 no estaba glucuronizado. El AUC de SN-38 unido a IMMU-132 en estos tumores fue de 54,3 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$, que es 135 veces mayor que la cantidad de SN-38 en los tumores de animales tratados con irinotecán durante el período de 2 h. que se pudo detectar SN-38, aunque los ratones que recibieron irinotecán recibieron 28 veces más equivalentes de SN-38 que los que recibieron IMMU-132 (es decir, 448 frente a 16 μg de equivalentes de SN-38, respectivamente).

30 Conclusiones

35 **[0208]** IMMU-132 es un anticuerpo anti-Trop-2 humanizado conjugado con 7,6 moléculas de SN-38, el metabolito activo del irinotecán, un inhibidor de la topoisomerasa I. Clínicamente, IMMU-132 ha mostrado una toxicidad manejable y respuestas alentadoras en pacientes con TNBC recidivante/refractario (ClinicalTrials.gov, NCT01631552). La terapia IMMU-132 sola demostró efectos antitumorales significativos en xenoinjertos de TNBC humanos a una dosis equivalente en humanos que es 5 veces menor que la que se usa clínicamente (es decir, 10 mg/kg). Dado que los estudios preclínicos indican que IMMU-132 se puede combinar con dos inhibidores de microtúbulos diferentes o un inhibidor de PARP con una actividad antitumoral significativamente mejorada, estos datos respaldan el uso de IMMU-132 y otros conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que causan el ADN. se rompe, en combinación con inhibidores de microtúbulos y/o inhibidores de PARP en general, así como otros agentes quimioterapéuticos que se dirigen a la división celular a través de la inhibición de microtúbulos o mecanismos de reparación de ADN. Una clase de ADC preferida está representada por conjugados de anticuerpos anti-Trop-2 en pacientes con cánceres positivos para Trop-2, incluidos, entre otros, TNBC, cáncer de colon metastásico, SCLC y NSCLC, ya que este es un objetivo que se expresa en grandes cantidades en una gran cantidad de cánceres, y se localiza en la superficie celular y en el citoplasma de las células cancerosas. Sin embargo, también se pueden usar otros objetivos de antígenos del cáncer para el ADC en esta aplicación si contienen un fármaco que también provoca roturas en el ADN, por ejemplo, al dirigirse a la topoisomerasa I, como SN-38.

40 **[0209]** La sinergia se logró cuando IMMU-132 se combinó con inhibidores de PARP (p. ej., olaparib) en líneas tumorales de TNBC que tenían defectos de BRCA1/2, así como expresión de tipo salvaje, incluido uno con solo un defecto de PTEN. Esto sugiere que IMMU-132 puede generar sinergia con cualquier tumor que tenga algún tipo de interrupción en las vías de recombinación homóloga de ADN. En combinación con olaparib, la terapia IMMU-132 logró efectos antitumorales significativos superiores a los observados con la monoterapia con cada uno, lo que resultó en 45 un beneficio de supervivencia significativo. IMMU-132 combinado con inhibidores de microtúbulos (p. ej., paclitaxel o mesilato de eribulina) también mejoró significativamente la eficacia en comparación con la monoterapia con cada agente.

50 **[0210]** En general, estos datos evidencian la ventaja significativa inesperada de la terapia de combinación con un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) que se dirige a las células cancerosas e induce roturas de la cadena de ADN, como IMMU-132, e inhibidores de microtúbulos o inhibidores de PARP. Apuntar a la vía de reparación del ADN PARP en tumores TNBC mutantes BRCA1/2 al combinar la terapia IMMU-132 con paclitaxel u olaparib logró letalidad sintética en este modelo de enfermedad sin toxicidad observable. En una forma de realización ejemplar, la combinación de IMMU-132 y un inhibidor de microtúbulos o PARP es útil para tratar cánceres positivos para Trop-2, como TNBC. Estos datos proporcionan la justificación para el uso de IMMU-132 en combinación con otros

quimioterapéuticos que también se dirigen a los mecanismos de reparación del ADN en pacientes con TNBC o tumores similares.

5 **Ejemplo 2. Terapia combinada con IMMU-114 (anti-HLA-DR) más inhibidor de quinasa de Bruton en leucemia linfocítica crónica (LLC)**

Diseño experimental.

10 [0211] Se sembraron células de leucemia de células B crónicas humanas (JVM-3) en una placa de 96 pocillos. A continuación, las células se incubaron con varias dosis del inhibidor de quinasa Bruton ibrutinib (1×10^{-5} a $3,9 \times 10^{-9}$ M) más una cantidad constante de IMMU-114 (0,25, 0,5, 0,75 o 1 nM) durante 96 h. La viabilidad celular se evaluó mediante ensayo MTS y se generaron curvas de dosis/respuesta basadas en el porcentaje de inhibición del crecimiento en relación con las células de control no tratadas. Los valores de IC_{50} se determinaron usando Prism Graph-Pad. Los datos se normalizaron y se generaron isobologramas para demostrar el efecto de IMMU-114 sobre ibrutinib en células JVM-3.

15 *Resultados*

20 [0212] Un ejemplo de como se ha mostrado en la **FIG. 5A** como IMMU-114 desplazó el IC_{50} de ibrutinib. Las células incubadas con ibrutinib solo dieron como resultado una IC_{50} de $2,2 \times 10^{-6}$ M. Sin embargo, cuando se combina 0,5 nM de IMMU-114 con ibrutinib, el valor de IC_{50} se reduce al doble a $1,08 \times 10^{-6}$ M. cabe señalar que IMMU-114 a 0,5 nM solo da como resultado una inhibición del crecimiento de aproximadamente un 22 %. Asimismo, IMMU-114 0,75 nM desplazó el valor de IC_{50} de ibrutinib hacia abajo 5,7 veces.

25 [0213] Estos datos, junto con los resultados de otros dos ensayos, se normalizaron para producir un isobolograma con el fin de determinar si esta interacción era sinérgica, aditiva o antagonista (**FIG. 6A**). Como se muestra, cuando las células JVM-3 se incubaron con ibrutinib combinado con IMMU-114, es evidente un efecto aditivo. Estos datos demuestran que, si bien cada agente por sí solo es capaz de inhibir el crecimiento de la LLC in vitro, cuando se combina se logra un efecto aditivo que respalda la combinación de terapias con IMMU-114 y quinasa Bruton en pacientes con LLC.

30 **Ejemplo 3. Terapia combinada con IMMU-114 (anti-HLA-DR) más inhibidor de fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) en leucemia linfocítica crónica (LLC)**

35 *Diseño experimental.*

40 [0214] Se sembraron células B de leucemia crónica humana (JVM-3) en una placa de 96 pocillos. Luego, las células se incubaron con varias dosis de un inhibidor de PI3K idelalisib (1×10^{-5} a $3,9 \times 10^{-9}$ M) más una cantidad constante de IMMU-114 (0,25, 0,5, 0,75 o 1 nM) durante 96 h. La viabilidad celular se evaluó mediante ensayo MTS y se generaron curvas de dosis/respuesta basadas en el porcentaje de inhibición del crecimiento en relación con las células de control no tratadas. Los valores de IC_{50} se determinaron usando Prism Graph-Pad. Los datos se normalizaron y se generaron isobologramas para demostrar el efecto de IMMU-114 sobre ibrutinib en células JVM-3.

45 *Resultados*

40 [0215] Al igual que con ibrutinib, IMMU-114 cambió la IC_{50} de idelalisib en células JVM-3 (**FIG. 5B**). Las células incubadas con idelalisib solo dieron como resultado una IC_{50} de $1,51 \times 10^{-6}$ M. Sin embargo, cuando se combinan 0,5 nM de IMMU-114 con idelalisib, el valor de IC_{50} cae 2 veces a $0,77 \times 10^{-6}$ M (IMMU-114 a 0,5 nM solo da como resultado una inhibición del crecimiento aproximada del 26 %. Asimismo, IMMU-114 1 nM desplazó el valor de IC_{50} de ibrutinib hacia abajo >18 veces.

55 [0216] Estos datos, junto con los resultados de otro ensayo, se normalizaron para producir un isobolograma (**FIG. 6B**). Como se muestra, se logró un efecto aditivo cuando las células JVM-3 se incubaron con idelalisib combinado con IMMU-114. Estos datos demuestran la utilidad de combinar IMMU-114 con un inhibidor de PI3K para tratar clínicamente la LLC.

Ejemplo 4. Tratamiento de leucemia linfocítica crónica recidivante con IMMU-114 e ibrutinib

60 [0217] Una mujer de 65 años con antecedentes de LLC, según la definición del Taller Internacional sobre Leucemia Linfocítica Crónica y las clasificaciones de la Organización Mundial de la Salud, presenta recidiva de la enfermedad después de tratamientos previos con fludarabina, dexametasona y rituximab, así como un régimen de CVP. Ahora tiene fiebre y sudores nocturnos asociados con un agrandamiento generalizado de los ganglios linfáticos, una producción reducida de hemoglobina y plaquetas, así como un recuento de leucocitos que aumenta rápidamente. Su LDH está elevada y la beta-2-microglobulina es casi el doble de lo normal. El paciente recibe terapia con anti-HLA-DR IMMU-114 (IgG4 hL243) a 200 mg administrados por vía subcutánea dos veces por semana. El anticuerpo se

administra en combinación con el inhibidor de la quinasa Bruton ibrutinib, administrado por vía oral en una dosis de 420 mg al día. Después de 6 semanas, la evaluación de los valores hematológicos y de laboratorio de la paciente indica que ha mostrado una respuesta parcial a la terapia combinada.

5 **Ejemplo 5. Tratamiento de linfoma no Hodgkin (LNH) en recaída/refractario con IMMU-114 e idelalisib**

[0218] Diecisiete pacientes con LNH folicular que no han respondido a rituximab y a un agente alquilante, o que han tenido una recaída dentro de los 6 meses posteriores a la recepción de esas terapias, reciben 200 mg de IMMU-114, inyectados s.c. dos veces por semana, en combinación con el inhibidor de PI3K idelalisib, administrado por vía oral a razón de 150 mg dos veces al día, hasta que la enfermedad progrese o el paciente se retire del estudio. Las respuestas se evalúan mediante tomografías computarizadas, con otras evaluaciones que incluyen eventos adversos, niveles sanguíneos de células B, niveles séricos de IMMU-114 y títulos humanos anti-IMMU-114 (HAHA).

[0219] Solo se observan reacciones de inyección transitorias ocasionales, de leves a moderadas, y no se observan otros problemas de seguridad, excepto neutropenia hasta el Grado 3 (pero reversible después de interrumpir el tratamiento hasta que se reduce al Grado 1). Se observa un agotamiento transitorio de células B (hasta aproximadamente un 25%). La tasa de respuesta objetiva (respuestas parciales más respuestas completas más respuestas completas no confirmadas) es del 47 % (8/17) con una tasa de respuesta completa/respuesta completa no confirmada del 24 % (4/17). Cuatro de las ocho respuestas objetivas continúan durante 30 semanas o más. Todas las muestras de suero evaluadas para anticuerpos humanos anti-IMMU-114 (HAHA) son negativas.

15 **Ejemplo 6. Conjugación de productos SN-38 bifuncionales a anticuerpos levemente reducidos**

[0220] El MAb humanizado anti-CEACAM5, hMN-14 (también conocido como labetuzumab), el MAb humanizado anti-CD22, hLL2 (también conocido como epratuzumab), el MAb humanizado anti-CD20, hA20 (también conocido como veltuzumab), el En estos estudios se utilizaron MAb humanizado EGP-1, hRS7, y MAb humanizado anti-mucina, hPAM4 (también conocido como clivatuzumab). Cada anticuerpo se redujo con ditiotreitol (DTT), utilizado en un exceso molar de 50 a 70 veces, en PBS 40 mM, pH 7,4, que contenía EDTA 5,4 mM, a 37 °C (baño) durante 45 min. El producto reducido se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño y/o diafiltración, y se intercambió el tampón por un tampón adecuado a pH 6,5. El contenido de tiol se determinó mediante el ensayo de Ellman y estuvo en el rango de 6,5 a 8,5 SH/IgG. Alternativamente, los anticuerpos se redujeron con Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) en tampón fosfato a un pH en el rango de 5-7, seguido de conjugación *in situ*. El MAb reducido se hizo reaccionar con un exceso molar de ~ 10 a 15 veces de CL2A-SN-38 (preparado como se describe en la Patente de EE. UU. n.º 7.999.083) utilizando DMSO a 7-15 % v/v como cosolvente, e incubando durante 20 min a temperatura ambiente. El conjugado se purificó por SEC centrifugada, paso a través de una columna hidrofóbica y finalmente por ultrafiltración-diafiltración. El producto se ensayó para SN-38 mediante la absorbancia a 366 nm y la correlación con los valores estándar, mientras que la concentración de proteína se dedujo de la absorbancia a 280 nm, corregida por el exceso de absorbancia de SN-38 a esta longitud de onda. De esta forma se determinaron las relaciones de sustitución SN-38/MAb. Los conjugados purificados se almacenaron como formulaciones liofilizadas en viales de vidrio, se taparon al vacío y se almacenaron en un congelador a -20 °C. En la **Tabla 10** se muestran las relaciones de sustitución molar (MSR) de SN-38 obtenidas para algunos de estos conjugados, que típicamente estaban en el rango de 5 a 7. El experto en la materia se dará cuenta de que el método de conjugación se puede aplicar a cualquier anticuerpo de uso en los métodos descritos.

45 **Tabla 10: Relaciones de sustitución molar (MSR) SN-38/MAb en algunos conjugados**

MAb	Conjugado	MSR
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

55 **Ejemplo 7. Eficacias terapéuticas *in vivo* en modelos preclínicos de carcinoma pancreático o de colon humano**

[0221] Se trataron ratones desnudos atípicos inmunocomprometidos (hembra), portadores de xenoinjertos subcutáneos de tumores pancreáticos o de colon humanos con conjugado CL2A-SN-38 específico o conjugado de control, o se dejaron sin tratar. Se observaron las eficacias terapéuticas de los conjugados específicos. **FIG. 7** muestra un modelo de tumor pancreático Capan 1, en el que los conjugados CL2A-SN-38 específicos de los anticuerpos hRS7 (anti-EGP-1), hPAM4 (anti-mucina) y hMN-14 (anti-CEACAM5) mostraron mejores eficacias que el control hA20. - Conjugado CL2A-SN-38 (anti-CD20) y control sin tratar. De manera similar, en un modelo BXPC3 de cáncer de páncreas humano, el hRS7-CL2A-SN-38 específico mostró una mejor eficacia terapéutica que los tratamientos de control (**FIG. 8**). Asimismo, en un modelo LS174T agresivo de carcinoma de colon humano, el tratamiento con hMN-14-CL2A-SN-38 específico fue más eficaz que la ausencia de tratamiento (**FIG. 9**).

Ejemplo 8. Terapia *in vivo* de metástasis pulmonares de tumores colónicos humanos GW-39 en ratones desnudos usando hMN-14-[CL1-SN-38] y hMN-14-[CL2-SN-38]

5 [0222] Se estableció un modelo metastásico de pulmón de carcinoma de colon en ratones desnudos mediante inyección iv de suspensión de tumor de colon humano GW-39, y la terapia se inició 14 días después. Conjugados de anticuerpos anti-CEACAM5 específicos, hMN14-CL1-SN-38 y hMN14-CL2-SN-38, así como conjugados de control de MAb anti-CD22 no dirigidos, hLL2-CL1-SN-38 y hLL2-CL2-SN-38 y Se inyectaron mezclas equivalentes de hMN14 y SN-38 en un programa de dosis de q4d x 8, usando diferentes dosis. **FIG. 10** (MSR = relación de sustitución molar de SN-38/anticuerpo) muestra efectos terapéuticos selectivos debido a los conjugados de hMN-14. A dosis equivalentes de 250 mg, los ratones tratados con hMN14-CL1-SN-38 o hMN14-CL2-SN-38 mostraron una mediana de supervivencia de más de 107 días. Los ratones tratados con los anticuerpos conjugados de control hLL2-CL1-SN-38 y hLL2-CL2-SN-38, que no se dirigen específicamente a las células de cáncer de pulmón, mostraron una mediana de supervivencia de 56 y 77 días, mientras que los ratones tratados con hMN14 IgG no conjugado y libres SN-38 mostró una mediana de supervivencia de 45 días, comparable con el control de solución salina sin tratar de 43,5 días. Se observó claramente un aumento significativo y sorprendente en la eficacia del conjugado de anticuerpo-SN-38 dirigido a células cancerosas conjugado, que fue sustancialmente más eficaz que el anticuerpo no conjugado y el agente quimioterapéutico libre solos. También se observó la sensibilidad a la dosis del efecto terapéutico del anticuerpo conjugado. Estos resultados demuestran la clara superioridad de los conjugados de anticuerpo SN-38 en comparación con el efecto combinado del anticuerpo no conjugado y el SN-38 libre en el mismo sistema de cáncer de pulmón humano *in vivo*.

Ejemplo 9. Uso del conjugado anti-Trop-2 IgG-SN-38 humanizado para el tratamiento eficaz de diversos cánceres epiteliales

25 *Resumen*

30 [0223] El propósito de este estudio fue evaluar la eficacia de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) SN-38-anti-Trop-2 contra varios tipos de tumores sólidos humanos, y evaluar su tolerabilidad en ratones y monos, este último con reactividad cruzada tisular, a hRS7 similar a los humanos. Dos derivados de SN-38, CL2-SN-38 y CL2A-SN-38, se conjugaron con el anticuerpo humanizado antiTrop-2, hRS7. Los inmunoconjugados se caracterizaron *in vitro* en cuanto a estabilidad, unión y citotoxicidad. La eficacia se probó 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 Cynomolgus.

35 [0224] Los conjugados de hRS7 de los dos derivados de SN-38 fueron equivalentes en sustitución de fármacos (~6), unión celular ($K_d \sim 1,2$ nmol/l), citotoxicidad ($IC_{50} \sim 2,2$ nmol/L) y estabilidad sérica *in vitro* ($t_{1/2} \sim 20$ horas). La exposición de las células al ADC demostró vías de señalización que conducen a la escisión de PARP, pero se observaron diferencias *frente a SN-38 libre en la regulación positiva de p53 y p21*. Efectos antitumorales significativos fueron producidos por hRS7-SN-38 a dosis no tóxicas en ratones portadores de tumores Calu-3 ($P \leq 0.05$), Capan-1 ($P < 0,018$), BxPC-3 ($P < 0,005$) y COLO 205 ($P < 0,033$) en comparación con los ADC de control no dirigidos. Los ratones toleraron una dosis de 2 x 12 mg/kg (equivalentes de SN-38) con solo elevaciones de corta duración en niveles de enzimas hepáticas ALT y AST. Los monos Cynomolgus infundidos con 2 x 0,96 mg/kg exhibieron solo disminuciones transitorias en los recuentos sanguíneos, aunque, lo que es más importante, los valores no cayeron por debajo de los rangos normales.

45 [0225] Concluimos 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. Fue bien tolerado en monos, con una expresión tisular de Trop-2 similar a la de los humanos. (Cardillo et al., 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69).

50 [0226] El tratamiento exitoso 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 no dirigidas de SN-38 como un medio para eludir la necesidad de esta conversión y administrar SN-38 de forma pasiva a los tumores. Conjugamos SN-38 covalentemente con un anticuerpo anti-Trop-2 humanizado, hRS7. Este conjugado de anticuerpo y fármaco tiene efectos antitumorales específicos en una variedad de modelos de xenoinjerto de cáncer humano sc, incluido el carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinomas de pulmón de células escamosas, colorrectal y pancreático, todos en dosis no tóxicas (p. ej., $\leq 3,2$ mg/ kg de dosis equivalente de SN-38).

60 [0227] 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 Cynomolgus para evaluar la seguridad clínica de este conjugado. Los monos toleraron 24 mg de equivalentes de SN-38/kg con solo toxicidades menores y reversibles. Dada su orientación al tumor y su perfil de seguridad, hRS7-SN-38 puede proporcionar una mejora en el tratamiento de los tumores sólidos que responden al irinotecán.

Introducción

[0228] El antígeno de 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 una variedad de carcinomas humanos y tiene significado pronóstico en algunos, estando asociado con una enfermedad más agresiva (ver, por ejemplo, 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 del papel funcional de Trop-2 en una línea celular de cáncer de páncreas de ratón transfectada con Trop-2 murino revelaron una mayor proliferación en condiciones de suero bajo, migración y crecimiento independiente del anclaje *in vitro*, y una tasa de crecimiento mejorada con evidencia de aumento de Ki-67 expresión *in vivo* y una mayor probabilidad de metástasis (Cubas et al., 2010, *Mol Cancer* 9:253).

[0229] La distribución del antígeno Trop-2 en muchos cánceres epiteliales lo convierte en un objetivo terapéutico atractivo. Stein y colegas (1993, *Int J Cancer* 55:938-46) caracterizaron un anticuerpo, denominado RS7-3G11 (RS7), que se unía a EGP-1, que estaba presente en varios tumores sólidos, pero el antígeno también se expresaba en algunos tejidos normales, generalmente en menor intensidad, o en regiones restringidas. Se documentaron eficacias terapéuticas y dirigidas en una serie de xenoinjertos de tumores humanos usando RS7 radiomarcado (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 de internalización no mostró actividad terapéutica en forma no conjugada (Shih et al., 1995, *Cancer Res* 55: 5857s-63s). Sin embargo, *in vitro* ha demostrado actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra carcinomas positivos para Trop-2.

[0230] Reportamos la preparación de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) utilizando una IgG anti-CEACAM5 (CD66e) acoplada a varios derivados de SN-38, un inhibidor de la topoisomerasa-I que es el componente activo del irinotecán, o CPT-11 (Moon et al. al., 2008, *J Med Chem* 51:6916-26; Govindan et al., 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-61). Los derivados variaron en sus propiedades de estabilidad sérica *in vitro*, y los estudios *in vivo* encontraron que una forma (designada como CL2) era más efectiva para prevenir o detener el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de páncreas y colon humanos que otros enlaces con mayor o menor estabilidad.

[0231] Es importante destacar que estos efectos ocurrieron en dosis no tóxicas, y las pruebas iniciales no lograron 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 crítica para el éxito de un ADC. Especulamos 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 internalización 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, el SN-38 acoplado a agentes extensores del plasma no dirigidos, como el polietilenglicol (PEG) o las micelas, ha demostrado una mayor eficacia que el irinotecán o el SN-38 solo (p. ej., Koizumi et al., 2006, *Cancer Res* 66:10048- 56), dando un apoyo adicional a este mecanismo.

[0232] Dada la amplia reactividad del anticuerpo RS7 con los cánceres epiteliales y su capacidad de internalización, planteamos la hipótesis de que un conjugado RS7-SN-38 podría beneficiarse no solo de la liberación sostenida del fármaco, sino también de la administración intracelular directa. Por lo tanto, preparamos y probamos la eficacia de los conjugados SN-38 utilizando una versión humanizada del anticuerpo murino RS7 (hRS7), en el que el SN-38 se unió al anticuerpo utilizando un enlazador CL2A mejorado, lo que mejoró la calidad del conjugado y su eficacia *in vivo* sin alterar su estabilidad *in vitro*. Este nuevo derivado (designado CL2A) es un agente preferido para el acoplamiento de SN-38 a anticuerpos.

[0233] En este documento, mostramos la eficacia del conjugado hRS7-SN-38 en varias líneas celulares de cáncer epitelial implantadas en ratones desnudos en dosis no tóxicas, y otros estudios revelan que se podrían tolerar dosis sustancialmente más altas. Más importante aún, los estudios de toxicidad en monos que también expresan Trop-2 en tejidos similares a los humanos mostraron que hRS7-SN-38 fue tolerado en cantidades apreciablemente mayores que la dosis terapéuticamente eficaz en ratones.

Materiales y métodos

[0234] Líneas celulares, anticuerpos y quimioterapéuticos. Todas las líneas celulares de cáncer humano utilizadas en este estudio se adquirieron de la American Type Culture Collection. Estos incluyen Calu-3 (carcinoma de pulmón de células no pequeñas), SK-MES-1 (carcinoma de pulmón de células escamosas), COLO 205 (adenocarcinoma de colon), Capan-1 y BxPC-3 (adenocarcinomas de páncreas) y PC-3 (adenocarcinomas prostáticos). IgG RS7 humanizado y anticuerpos anti-CD20 (hA20 IgG, veltuzumab) y anti-CD22 (hLL2 IgG, epratuzumab) humanizados de control se prepararon en Immunomedics, Inc. El irinotecán (20 mg/ml) se obtuvo de Hospira, Inc.

[0235] Inmunoconjungados SN-38 y aspectos *in vitro*. La síntesis de CL2-SN-38 se ha descrito previamente (Moon et al., 2008, *J Med Chem* 51:6916-26). Su conjugación con hRS7 IgG y la estabilidad en suero se realizaron como se describe (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 (MW 1480) y su conjugado hRS7 y los estudios de estabilidad, unión y citotoxicidad se

realizaron como se describió anteriormente (Moon et al., 2008, J Med Chem 51:6916-26). Se prepararon lisados celulares y se realizó inmunotransferencia para p21^{Waf1/Cip}, p53 y PARP (poli-ADP-ribosa polimerasa).

[0236] Estudios terapéuticos *in vivo*. Para todos los estudios en animales, las dosis de inmunoconjungados de SN-38 e irinotecán se muestran en equivalentes de SN-38. Sobre la base de una proporción media de sustitución 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). Se compraron ratones desnudos atípicos (*nu/nu*) hembra NCr, de 4 a 8 semanas de edad, y ratones macho SwissWebster, de 10 semanas de edad, de Taconic Farms. Los estudios de tolerabilidad se realizaron en monos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*; 2,5-4 kg macho y hembra) por SNBL USA, Ltd. A los animales se les implantó por vía subcutánea diferentes líneas celulares de cáncer humano. El volumen del tumor (TV) se determinó mediante mediciones en 2 dimensiones utilizando calibres, con volúmenes definidos como: $L \times w^2/2$, donde L es la dimensión más larga del tumor y w es la más corta. Los tumores variaban en tamaño entre 0,10 y 0,47 cm³ cuando comenzó la terapia. Los regímenes de tratamiento, las dosis y el número de animales en cada experimento se describen en los Resultados. El hRS7-CL2A-SN-38 liofilizado y el ADC de control se reconstituyeron y diluyeron según se requería en solución salina estéril. Todos los reactivos se administraron por vía intraperitoneal (0,1 ml), excepto el irinotecán, que se administró por vía intravenosa. El régimen de dosificación estuvo influenciado por nuestras investigaciones previas, donde el ADC se administró 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 vida media en suero del conjugado *in vitro*, para permitir una exposición más continua al ADC.

[0237] Estadísticas. Las curvas de crecimiento se determinaron como cambio porcentual en el TV inicial a lo largo del tiempo. El análisis estadístico del crecimiento tumoral se basó en el área bajo la curva (AUC). Los perfiles de crecimiento tumoral individual se obtuvieron a través de modelos 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. Se usó una prueba *t* de 2 colas para evaluar la significación estadística entre los diversos grupos de tratamiento y controles, excepto para el control de solución salina, donde se usó una prueba *t* de 1 cola (significación en $P \leq 0,05$). Las comparaciones estadísticas de AUC se realizaron solo hasta el momento en que el primer animal dentro de un grupo fue sacrificado debido a la progresión.

[0238] Farmacocinética y biodistribución. Se inyectaron hRS7-CL2A-SN-38 y hRS7 IgG radiomarcados con ¹¹¹In en ratones desnudos que tenían tumores SK-MES-1 s.c. (~0,3 cm³). A un grupo se le inyectó por vía intravenosa 20 µCi (250 µg de proteína) de ¹¹¹In-hRS7-CL2A-SN-38, mientras que otro grupo recibió 20 µCi (250 µg de proteína) de ¹¹¹In-hRS7 IgG. En varios puntos de tiempo, los ratones (5 por punto de tiempo) fueron anestesiados, sangrados mediante punción intracardíaca y luego sacrificados. Los tumores y diversos tejidos se extrajeron, pesaron y contaron mediante centelleo y para determinar el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g). A un tercer grupo se le inyectó 250 µg de hRS7-CL2A-SN-38 sin marcar 3 días antes de la administración de ¹¹¹In-hRS7-CL2A-SN-38 y se le realizó la necropsia. Se usó una prueba *t* de 2 colas para comparar la captación de hRS7-CL2A-SN-38 y hRS7 IgG después de determinar la igualdad de varianza usando la prueba *f*. El análisis farmacocinético del aclaramiento sanguíneo se realizó utilizando el software WinNonLin (Parsight Corp.).

[0239] Tolerabilidad en ratones Swiss-Webster y monos *Cynomolgus*. Brevemente, los ratones se clasificaron en 4 grupos cada uno para recibir inyecciones i.p. de 2 ml de un control de tampón de acetato de sodio o 3 dosis diferentes de hRS7-CL2A-SN-38 (4, 8 o 12 mg/kg de SN-38) en los días 0 y 3 seguido de la recolección de sangre y suero, como se describe en Resultados. Monos *Cynomolgus* (3 machos y 3 hembras; 2,5-4,0 kg) se les administraron 2 dosis diferentes de hRS7-CL2A-SN-38. Las dosis, tiempos y número de monos desangrados para la evaluación de posibles toxicidades hematológicas y químicas séricas se describen en los Resultados.

50 Resultados

[0240] Estabilidad y potencia de hRS7-CL2A-SN-38. Se usaron dos enlaces diferentes para conjugar SN-38 con hRS7 IgG. El primero se denomina CL2-SN-38 y se ha descrito previamente (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 el resto de fenilalanina. Este cambio simplificó la síntesis, pero no afectó el resultado de la conjugación (p. ej., tanto CL2-SN-38 como CL2A-SN-38 incorporaron ~6 SN-38 por molécula de IgG). Las comparaciones lado a lado no encontraron diferencias significativas en la estabilidad del suero, la unión al antígeno o la citotoxicidad *in vitro* (no se muestra).

[0241] Para confirmar que el cambio en el conector SN-38 de CL2 a CL2A no afectó la potencia *in vivo*, se compararon hRS7-CL2A y hRS7-CL2-SN-38 en ratones con tumores COLO 205 o Capan-1 (no se muestra), utilizando 0,4 mg o 0,2 mg/kg de SN-38 dos veces por semana durante x 4 semanas, respectivamente, y con tumores iniciales de 0,25 cm³ de tamaño en ambos estudios. Tanto los conjugados hRS7-CL2A como CL2-SN-38 inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con los no tratados (AUC_{14 días} $P < 0,002$ frente a solución salina en el modelo COLO 205; AUC_{21 días} $P < 0,001$ frente a solución salina en el modelo Capan-1), y una ADC de

control anti-CD20 no dirigido, hA20-CL2A-SN-38 (AUC₁₄ días $P < 0,003$ en el modelo COLO-205; AUC₃₅ días: $P < 0,002$ 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 hRS7-CL2-SN-38 estaban libres de tumor, mientras que sólo el 20 % de los animales tratados con hA20-ADC no tenían signos visibles de enfermedad.

[0242] Mecanismo de acción. Los estudios de citotoxicidad *in vitro* demostraron que hRS7-CL2A-SN-38 tenía valores de Cl_{50} en el rango de nmol/L contra varias líneas de tumores sólidos diferentes (**Tabla 11**). El Cl_{50} 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 relación Cl_{50} del ADC versus el SN-38 libre fue menor en las células con mayor expresión de Trop-2, lo que probablemente refleja la mayor capacidad de internalizar el fármaco cuando hay más antígeno presente.

Tabla 11. Expresión de Trop-2 y citotoxicidad <i>in vitro</i> de SN-38 y hRS7-SN-38 en varias líneas tumorales sólidas								
Expresión de Trop-2 a través de FACS			Resultados de citotoxicidad					
Línea celular	Fluorescencia mediana (fondo)	Porcentaje positivo	SN-38	95 % CI	hRS7-SN-38 ^a	95 % CI	Relación ADC/SN-38 libre	
			Cl_{50} (nmol/l)	Cl_{50} (nmol/l)	Cl_{50} (nmol/l)	Cl_{50} (nmol/l)		
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	0,66-1,57	1,95	1,26-3,01	1,91	
Capan- 1	100,0 (5,0)	94,2%	3,50	2,17-5,65	6,99	5,02-9,72	2,00	
PC-3	1146,2 (5,5)	73,6%	1,86	1,16-2,99 4,24		2,99-6,01 2,28		
SKMES-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	1,04-2,00 4,03		3,25-4,98 2,80		

^aValor Cl_{50} se muestra como equivalentes SN-38 de hRS7-SN-38

[0243] Se sabe que SN-38 activa varias vías de señalización en las células, lo que lleva a la apoptosis. Nuestros estudios iniciales examinaron la expresión de 2 proteínas involucradas en eventos de señalización temprana (p21^{WAF1/Cip1} y p53) y 1 evento apoptótico tardío [escisión de poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP)] *in vitro* (no se muestra). En BxPC-3, SN-38 condujo a un aumento de 20 veces en la expresión de p21^{WAF1/Cip1}, mientras que hRS7-CL2A-SN-38 resultó en solo un aumento de 10 veces, un hallazgo consistente con la mayor actividad con SN-38 libre en esta línea celular (**Tabla 11**). Sin embargo, hRS7-CL2A-SN-38 aumentó la expresión de p21^{WAF1/Cip1} en Calu-3 más de 2 veces sobre SN-38 libre (no mostrado).

[0244] Se observó una mayor disparidad entre los eventos de señalización mediados por hRS7-CL2A-SN-38 y SN-38 libre en la expresión de p53. Tanto en BxPC-3 como en Calu-3, la regulación al alza de p53 con SN-38 libre no fue evidente hasta las 48 horas, mientras que hRS7-CL2A-SN-38 reguló al alza a p53 en 24 horas (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 mostrado). Curiosamente, aunque hRS7 IgG no tuvo un efecto apreciable en la expresión de p21^{WAF1/Cip1}, indujo la regulación positiva de p53 tanto en BxPC-3 como en Calu-3, pero solo después de una exposición de 48 horas. En términos de eventos apoptóticos posteriores, la escisión de PARP fue evidente en ambas líneas celulares cuando se incubaron con SN-38 o el conjugado (no mostrado). La presencia de la PARP escindida fue mayor a las 24 horas en BxPC-3, lo que se correlaciona con una alta expresión de p21 y su menor Cl_{50} . El mayor grado de escisión con SN-38 libre sobre el ADC fue consistente con los hallazgos de citotoxicidad.

[0245] Eficacia de hRS7-SN-38. Debido a que Trop-2 se expresa ampliamente en varios carcinomas humanos, se realizaron estudios en varios modelos de cáncer humano diferentes, que comenzaron con una evaluación del enlace hRS7-CL2-SN-38, pero luego se usaron conjugados con el enlace CL2A. Los ratones desnudos portadores de Calu-3 que recibieron 0,04 mg de SN-38/kg de hRS7-CL2-SN-38 cada 4 días x 4 tuvieron una respuesta significativamente mejorada en comparación con los animales a los que se les administró la cantidad equivalente de hLL2-CL2-SN-38 (TV = $0,14 \pm 0,22 \text{ cm}^3$ frente a $0,80 \pm 0,91 \text{ cm}^3$, respectivamente, AUC₄₂ días $P < 0,026$; **FIG. 11A**). Se observó una respuesta a la dosis cuando se aumentó la dosis a 0,4 mg/kg de SN-38. Con este nivel de dosis más alto, todos los ratones que recibieron el conjugado específico de hRS7 se "curaron" en 28 días y permanecieron libres de tumores hasta el final del estudio el día 147, mientras que los tumores volvieron a crecer en los animales tratados con el ADC irrelevante (específico vs. irrelevante AUC₉₈ días: $P = 0,05$). En ratones que recibieron la mezcla de hRS7 IgG y SN-38, los tumores progresaron >4,5 veces el día 56 (TV = $1,10 \pm 0,88 \text{ cm}^3$, AUC₅₆ días $P < 0,006$ frente a hRS7-CL2-SN-38).

[0246] También se examinó la eficacia en xenoinjertos de tumores colónicos humanos (COLO 205) y pancreáticos (Capan-1). En animales portadores de tumores COLO 205, (**FIG. 11B**), hRS7-CL2-SN-38 (0,4 mg/kg, q4dx8) impidió el crecimiento tumoral durante el período de tratamiento de 28 días con tumores significativamente más pequeños en

comparación con ADC anti-CD20 de control (hA20-CL2-SN-38), o hRS7 IgG (TV = 0,16 ± 0,09 cm³, 1,19 ± 0,59 cm³ y 1,77 ± 0,93 cm³, respectivamente; AUC_{28 días} $P < 0,016$). La MTD de irinotecan (24 mg SN-38/kg, q2dx5) fue tan efectiva como hRS7-CL2-SN-38, porque el suero de ratón puede convertir el irinotecan en SN-38 de manera más eficiente que el suero humano, pero la dosis de SN-38 en el irinotecán (2.400 µg acumulativos) fue 37,5 veces mayor que con el conjugado (64 µg en total).

[0247] Los animales que portaban Capan-1 no mostraron una respuesta significativa al irinotecán solo cuando se les administró una dosis de SN-38 equivalente al conjugado hRS7-CL2-SN-38 (p. ej., en el día 35, el tamaño tumoral promedio fue de 0,04 x 0,05 cm³ en animales 0,4 mg de SN-38/kg hRS7-SN-38 frente a 1,78 x 0,62 cm³ en animales tratados con irinotecán que recibieron 0,4 mg/kg de SN-38; AUC_{día 35} $P < 0,001$; **FIG. 11C**). Cuando la dosis de irinotecán se aumentó 10 veces a 4 mg/kg de SN-38, la respuesta mejoró, pero aún no fue tan significativa como el conjugado al nivel de dosis de 0,4 mg/kg de SN-38 (TV = 0,17 ± 0,18 cm³ vs. 1,69 ± 0,47 cm³, AUC_{día 49} $P < 0,001$). Una dosis igual de hA20-CL2-SN-38 no dirigido también tuvo un efecto antitumoral significativo en comparación con los animales tratados con irinotecán, pero el conjugado específico de hRS7 fue significativamente mejor que el ADC irrelevante (TV = 0,17 ± 0,18 cm³ frente a 0,80 ± 0,68 cm³, AUC_{día 49} $P < 0,018$).

[0248] 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 (**FIG. 11D**), hRS7-CL2A-SN-38 nuevamente inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con ratones de control tratados con solución salina o una cantidad equivalente de hA20-CL2A-SN-38 no dirigido (TV = 0,24 ± 0,11 cm³ frente a 1,17 ± 0,45 cm³ y 1,05 ± 0,73 cm³, respectivamente; AUC_{día 21} $P < 0,001$), o irinotecán administrado a una dosis equivalente de SN-38 10 veces superior (TV = 0,27 ± 0,18 cm³ frente a 0,90 ± 0,62 cm³, respectivamente, AUC_{día 25} $P < 0,004$). Curiosamente, en ratones portadores de tumores de pulmón de células escamosas humanas SK-MES-1 tratados con 0,4 mg/kg de ADC (**FIG. 11E**), la inhibición del crecimiento tumoral fue superior a la solución salina o hRS7 IgG no conjugada (TV = 0,36 x 0,25 cm³ frente a 1,02 ± 0,70 cm³ y 1,30 ± 1,08 cm³, respectivamente; AUC_{28 días}, $P < 0,043$), pero no apuntar a hA20-CL2A-SN-38 o la MTD de irinotecan proporcionó los mismos efectos antitumorales que el hRS7-SN-38 específico conjugado. En todos los estudios murinos, el ADC hRS7-SN-38 fue bien tolerado en términos de pérdida de peso corporal (no mostrado).

[0249] Biodistribución de hRS7-CL2A-SN-38. Las biodistribuciones de hRS7-CL2A-SN-38 o hRS7 IgG no conjugada se compararon en ratones que portaban xenoinjertos de carcinoma de pulmón de células escamosas humanas SK-MES-1 (no mostrado), utilizando los respectivos sustratos marcados con ¹¹¹In. Se realizó un análisis farmacocinético para determinar el aclaramiento de hRS7-CL2A-SN-38 en relación con hRS7 no conjugado (no mostrado). El ADC se eliminó más rápido que la cantidad equivalente de hRS7 no conjugado, y el ADC exhibió una vida media y un tiempo de residencia medio aproximadamente un 40 % más cortos. No obstante, esto tuvo un impacto mínimo en la captación del tumor (no mostrado). 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). A las 24 horas posteriores a la inyección, había >2 veces más hRS7-CL2ASN-38 en el hígado que hRS7 IgG. Por el contrario, en el bazo había 3 veces más hRS7 IgG parental presente en la captación máxima (punto de tiempo de 48 horas) que hRS7-CL2A-SN-38. La captación y aclaramiento en el resto de los tejidos generalmente reflejaron diferencias en la concentración en sangre.

[0250] Debido a que se administraron dosis dos veces por semana para la terapia, la captación tumoral en un grupo de animales que recibieron por primera vez una dosis previa de 0,2 mg/kg (250 µg de proteína) del ADC hRS7 3 días antes de la inyección del anticuerpo marcado con ¹¹¹In fue menor. examinado. La captación tumoral de ¹¹¹In-hRS7-CL2A-SN-38 en ratones predosificados se redujo sustancialmente en cada punto de tiempo en comparación con los animales que no recibieron la predosis (p. ej., a las 72 horas, la captación tumoral predosificada fue del 12,5 % ± 3,8 % DI/g frente a 25,4 % ± 8,1 % DI/g en animales que no recibieron la predosis; $P = 0,0123$). La dosificación previa no tuvo un impacto apreciable en el aclaramiento sanguíneo o la absorción tisular (no mostrado). Estos estudios sugieren que en algunos modelos tumorales, la acumulación tumoral del anticuerpo específico puede reducirse con la(s) dosis(es) anterior(es), lo que probablemente explica por qué la especificidad de una respuesta terapéutica podría disminuir al aumentar las dosis de ADC y por qué no es necesario aumentar más la dosis indicada.

[0251] Tolerabilidad de hRS7-CL2A-SN-38 en ratones Swiss-Webster y monos Cynomolgus. Los ratones Swiss-Webster toleraron 2 dosis durante 3 días, cada una de 4, 8 y 12 mg de SN-38/kg de hRS7-CL2A-SN-38, con una pérdida de peso transitoria mínima (no se muestra). No se produjo toxicidad hematopoyética y las químicas séricas solo revelaron niveles elevados de transaminasa de aspartato (AST) y transaminasa de alanina (no mostrada). Siete días después del tratamiento, la AST aumentó por encima de los niveles normales (>298 U/l) en los 3 grupos de tratamiento (no se muestra), con la mayor proporción de ratones en el grupo de 2 x 8 mg/kg. Sin embargo, a los 15 días posteriores al tratamiento, la mayoría de los animales estaban dentro del rango normal. Los niveles de ALT también estuvieron por encima del rango normal (>77 U/l) dentro de los 7 días de tratamiento (no se muestra) y con evidencia de normalización el día 15. Los hígados de todos estos ratones no mostraron evidencia histológica de daño tisular (no se muestra). En cuanto a la función renal, solo los niveles de glucosa y cloruro estaban algo elevados en los grupos tratados. A 2 x 8 mg/kg, 5 de 7 ratones tenían niveles de glucosa ligeramente elevados (rango de 273-320 mg/dl, extremo superior de lo normal 263 mg/dl) que volvieron a la normalidad 15 días después de la inyección. De

manera similar, los niveles de cloruro estaban levemente elevados, con un rango de 116 a 127 mmol/l (extremo superior del rango normal 115 mmol/l) en los 2 grupos de dosis más altas (57 % en el grupo de 2 x 8 mg/kg y 100 % del grupo de 2 x 12 mg/kg), y permaneció elevada hasta 15 días después de la inyección. Esto también podría ser indicativo de toxicidad gastrointestinal, porque la mayor parte del cloruro se obtiene a través de la absorción en el intestino; sin embargo, al terminar, no hubo evidencia histológica de daño tisular en ningún sistema de órganos examinado (no mostrado).

[0252] Debido a que los ratones no expresan Trop-2 unida por hRS7, se requirió un modelo más adecuado para determinar el potencial del conjugado hRS7 para uso clínico. Los estudios de inmunohistología revelaron la unión en múltiples tejidos tanto en humanos como en monos Cynomolgus (mama, ojo, tracto gastrointestinal, riñón, pulmón, ovario, trompa de Falopio, páncreas, paratiroides, próstata, glándula salival, piel, timo, tiroides, amígdala, uréter, orina vejiga y útero; no se muestra). En base a esta reactividad cruzada, se realizó un estudio de tolerabilidad en monos.

[0253] El grupo que recibió 2 x 0,96 mg SN-38/kg de hRS7-CL2A-SN-38 no tuvo eventos clínicos significativos 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 el día 15. Se observaron disminuciones transitorias en la mayoría de los datos del hemograma (no se muestran), pero los valores no cayeron por debajo de los rangos normales. No se encontraron valores anormales en las químicas del suero. 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 los órganos hematopoyéticos (timo, ganglios linfáticos mandibulares y mesentéricos, bazo y médula ósea), órganos gastrointestinales (estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon y recto), los órganos reproductivos femeninos (ovario, útero y vagina) y en el lugar de la inyección. Estos cambios variaron de mínimos a moderados y se revirtieron por completo al final del período de recuperación (día 32) en todos los tejidos, excepto en el timo y el tracto gastrointestinal, que tendían a una recuperación total en este punto de tiempo posterior.

[0254] Con 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 dentro de este grupo mostraron eventos adversos similares, pero más graves que los 2 x 0,96 mg/kg grupo. Estos datos indican que las toxicidades limitantes de la dosis fueron idénticas a las del irinotecán; a saber, intestinal y hematológico. Por lo tanto, la MTD para hRS7-CL2A-SN-38 se encuentra entre 2 x 0,96 y 1,92 mg SN-38/kg, lo que representa una dosis equivalente en humanos de 2 x 0,3 a 0,6 mg/kg SN-38.

Discusión

[0255] Trop-2 es una proteína expresada en muchos tumores epiteliales, incluidos los cánceres de pulmón, mama, colorrectal, páncreas, próstata y ovario, lo que la convierte en un objetivo potencialmente importante para la administración de agentes citotóxicos. El anticuerpo RS7 se internaliza cuando se une a Trop-2 (Shih et al., 1995, Cancer Res 55:5857s-63s), lo que permite la administración intracelular directa de citotóxicos.

[0256] La conjugación de fármacos quimioterapéuticos con anticuerpos se ha explorado durante más de 30 años. Debido a 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 de órganos normales antes de alcanzar el nivel terapéutico en los tumores. Al igual que con cualquier tratamiento, la ventana terapéutica es un factor clave que determina el potencial de un ADC y, por lo tanto, en lugar de examinar fármacos "ultratóxicos", elegimos SN-38 como el componente farmacológico del ADC dirigido a Trop-2.

[0257] SN-38 es un potente inhibidor de la topoisomerasa-I, con valores IC_{50} en el rango nanomolar en varias líneas celulares. Es la forma activa del profármaco, irinotecan, que se usa para el tratamiento del cáncer colorrectal y que también tiene actividad en los cánceres de pulmón, mama y cerebro. Razonamos que un SN-38 dirigido directamente, en forma de ADC, sería una terapia significativamente mejorada sobre CPT-11, al superar la bioconversión baja y variable del paciente de este último a SN-38 activo.

[0258] 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 de síntesis, en CL2A, se eliminó la fenilalanina y, por lo tanto, se eliminó el sitio de escisión de la catepsina B. Curiosamente, 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 un impacto negativo en la unión, la estabilidad o la potencia del conjugado en las pruebas de lado a lado. 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 con el anillo de lactona de SN-38 y no por el sitio de escisión de la catepsina B.

[0259] La citotoxicidad *in vitro* de hRS7 ADC frente a una variedad de líneas de células tumorales sólidas tuvo consistentemente valores IC_{50} en el rango de nmol/L. Sin embargo, las células expuestas a SN-38 libre demostraron un valor IC_{50} más bajo en comparación con el ADC. Esta disparidad entre SN-38 libre y conjugado también se informó 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 entre 3,5 y 4 moléculas de SN-38 por PEG, mientras que NK012

5 es una nanopartícula de micela que contiene un 20 % de SN-38 en peso. Con nuestro ADC, esta disparidad (es decir, la proporción de potencia con SN-38 libre frente a conjugado) disminuyó a medida que aumentaron los niveles de expresión de Trop-2 en las células tumorales, lo que sugiere una ventaja para la administración dirigida del fármaco. En términos de 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 breve *t_{1/2}* de 12,3 minutos informada para ENZ-2208 (Zhao et al., 2008, Bioconjug Chem 19:849-59), pero similar al 57 % de liberación de SN-38 de NK012 en condiciones fisiológicas después de 24 horas (Koizumi et al., 2006, Cancer Res 66:10048-56).

10 [0260] El tratamiento de ratones portadores de tumores con hRS7-SN-38 (ya sea con CL2-SN-38 o CL2A-SN-38) inhibió significativamente el crecimiento del tumor 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 estaban libres de tumores al finalizar el estudio. A diferencia de los humanos, el irinotecán se convierte de manera muy eficiente en SN-38 mediante una esterasa plasmática en ratones, con una tasa de conversión superior al 50 % y con una mayor eficacia en ratones que en humanos. Cuando se administró irinotecán a niveles de SN-38 10 veces 15 más altos o equivalentes, hRS7-SN-38 fue significativamente mejor en el control del crecimiento tumoral. Solo cuando se administró irinotecán en su MTD de 24 mg/kg q2dx5 (37,5 veces más SN-38) igualó la eficacia de hRS7-SN-38. En pacientes, esperaríamos que esta ventaja favoreciera aún más a hRS7-CL2A-SN-38, porque la bioconversión de irinotecán sería sustancialmente menor.

20 [0261] También demostramos en algunas líneas celulares que expresan antígenos, como SK-MES-1, que el uso de un ADC de unión a antígeno no garantiza mejores respuestas terapéuticas que un conjugado irrelevante que no se une. Este no es un hallazgo inusual o inesperado. De hecho, los conjugados de SN-38 que no se unen mencionados anteriormente mejoran la actividad terapéutica en comparación con el irinotecán, por lo que se espera que un conjugado de IgG-SN-38 irrelevante tenga cierta actividad. Esto está relacionado con el hecho de que los tumores 25 tienen vasos inmaduros con fugas 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 se reduzca a un nivel que imite los niveles lisosomales (p. ej., pH 5,3 a 37 °C; datos no mostrados), mientras que al pH neutro de suero, la tasa de liberación se reduce casi 2 veces. Si un conjugado irrelevante entra en un microambiente tumoral ácido, se espera que libere algo de SN-38 localmente. Otros factores, como la fisiología del tumor y las sensibilidades innatas al 30 fármaco, también desempeñarán un papel en la definición de esta actividad "básica". Sin embargo, un conjugado específico con un tiempo de residencia más largo debería tener una potencia mejorada sobre esta respuesta de referencia siempre que haya suficiente antígeno para capturar el anticuerpo específico. Los estudios de biodistribución en el modelo SKMES-1 también mostraron que si el antígeno tumoral se satura como consecuencia de dosis sucesivas, se reduce la captación tumoral del conjugado específico, lo que produce resultados terapéuticos similares 35 a los encontrados con un conjugado irrelevante.

40 [0262] Aunque es difícil hacer comparaciones directas entre nuestro ADC y los informes publicados de otros agentes de entrega 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, solo se administraron 4 inyecciones para una dosis total acumulada de 1,6 mg/kg de SN-38 o 32 µg de SN-38 en un ratón de 20 g. Se realizaron múltiples estudios con ENZ-2208 usando su MTD de 10 mg/kg x 5, y los estudios preclínicos con NK012 involucraron su MTD de 30 mg/kg x 3. Por lo tanto, se obtuvieron efectos antitumorales significativos con hRS7-SN-38 a 30 veces y 55 veces menos equivalentes de SN-38 que las dosis notificadas en ENZ-2208 y NK012, respectivamente. Incluso con 10 veces menos ADC de hRS7 (0,04 mg/kg), se observaron efectos antitumorales significativos, mientras que no se presentaron 45 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 (1500 mg/kg del conjugado), lo que indica que la MTD era mayor. Por lo tanto, los animales portadores de tumores fueron tratados eficazmente con cantidades de equivalentes de SN- 50 38 de 7,5 a 15 veces menores.

55 [0263] Como inhibidor de la topoisomerasa-I, SN-38 induce un daño significativo en el ADN de una célula, con una regulación al alza de p53 y p21^{WAF1/Cip1} que da como resultado la activación de la caspasa y la escisión de PARP. Cuando expusimos las células BxPC-3 y Calu-3 a nuestro ADC, tanto p53 como p21^{WAF1/Cip1} aumentaron por encima de los niveles basales. Además, la escisión de PARP también fue evidente en ambas líneas celulares, lo que confirma un evento apoptótico en estas células. De interés fue la mayor regulación positiva de p21^{WAF1/Cip1} 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 el uso de una vía independiente de p53 para la apoptosis mediada por p21^{WAF1/Cip1}.

60 [0264] Una observación interesante fue la regulación ascendente temprana de p53 tanto en BxPC-3 como en Calu-3 a las 24 horas mediada por el hRS7-ADC en relación con el SN-38 libre. Incluso la IgG hRS7 desnuda podría aumentar p53 en estas líneas celulares, aunque solo después de una exposición de 48 horas. La sobreexpresión de Trop-2 y el entrecruzamiento por parte de los anticuerpos se ha relacionado con varios eventos de señalización relacionados con MAPK, así como con la liberación de calcio intracelular. Si bien la unión de hRS7 no fue suficiente 65 para inducir la apoptosis en BxPC-3 y Calu-3, como lo demuestra la falta de escisión de PARP, puede ser suficiente

para cebar una célula, de modo 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 vías están involucradas con la entrega 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.

5 [0265] Los estudios de biodistribución revelaron que hRS7-CL2A-SN-38 tenía una absorción tumoral similar a la hRS7 IgG parental, pero se eliminaba sustancialmente más rápido con una absorción hepática dos veces mayor, lo que puede deberse a la hidrofobicidad de SN-38. Eliminándose el ADC a través del hígado, se esperaba que las toxicidades hepáticas y gastrointestinales fueran limitantes de la dosis. Aunque los ratones tenían evidencia de 10 aumento de las transaminasas hepáticas, la toxicidad gastrointestinal fue leve en el mejor de los casos, con solo una pérdida transitoria de peso y no se observaron anomalías en el examen histopatológico. Curiosamente, 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 la dosis limitante.

15 [0266] Debido a que Trop-2 reconocido por hRS7 no se expresa en ratones, era de vital importancia realizar estudios de toxicidad en monos que tienen una expresión tisular de Trop-2 similar a la de los humanos. Los monos toleraron 0,96 mg/kg/dosis (\sim 12 mg/m²) con toxicidad leve y reversible, que se extrapola a una dosis humana de \sim 0,3 mg/kg/dosis (\sim 11 mg/m²). En un ensayo clínico de fase I de NK012, los pacientes con tumores sólidos toleraron 28 mg/m² 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). Del mismo modo, los ensayos clínicos de fase I con ENZ-2208 revelaron una neutropenia febril limitante de la dosis, recomendándose administrar 10 mg/m² cada 3 semanas o 16 mg/m² si se administraba G-CSF a los pacientes. Debido a que los monos toleraron una dosis equivalente humana acumulada de 22 mg/m², es posible que, aunque hRS7 se una a varios tejidos normales, la MTD para un solo tratamiento del ADC de hRS7 podría ser similar a la de otros agentes SN-38 no dirigidos. 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 fue similar al del irinotecán. Más importante aún, si la actividad antitumoral se puede lograr en humanos como en ratones que respondieron con una dosis equivalente humana de solo 0,03 mg de equivalentes/kg/dosis de SN-38, entonces se podrían lograr respuestas antitumorales clínicamente significativas.

30 [0267] En conclusión, los estudios de toxicología en monos, combinados con modelos de xenoinjerto de cáncer humano *in vivo* en ratones, han indicado que este ADC dirigido a Trop-2 es un tratamiento eficaz en varios tumores de diferente origen epitelial.

35 **Ejemplo 10. Eficacia del anticuerpo anti-Trop-2 conjugado con una forma de profármaco de 2-pirrolinodoxorrubicina (2-PDox)**

[0268] Se preparó una forma de profármaco de 2-PDox (denominada pro-2-PDox) y se conjugó con anticuerpos como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. 14/175.089. A menos que se indique lo contrario a continuación, el número de fracciones de fármaco por molécula de anticuerpo estaba en el intervalo de aproximadamente 6,5 a 40 aproximadamente 7,5.

45 [0269] Estudios de unión celular in vitro: La retención de la unión del anticuerpo se confirmó mediante ensayos de unión celular que compararon la unión del anticuerpo conjugado con el no conjugado (Chari, 2008, Acc Chem Res 41:98-107). La potencia del conjugado se probó en un ensayo MTS de 4 días usando células diana apropiadas. El ADC anti-Trop-2 (hRS7-pro-2-PDox) exhibió valores IC_{50} de 0,35-1,09 nM en líneas celulares de cáncer gástrico (NCI-N87), pancreático (Capan-1) y de mama (MDA-MB-468) humanas, con fármaco libre que exhibe una potencia de 0,02-0,07 nM en las mismas líneas celulares. En estudios adicionales, se observó que hRS7-pro-2-PDox era citotóxico para MDA-MB-468, AG S, NCI-N87 y líneas celulares de tumor sólido Capan-1 (no se muestra).

50 [0270] No se observaron diferencias significativas en la unión del resto de anticuerpo a células de carcinoma gástrico NCI-N87 entre hRS7 no conjugado y pro-2-PDox-hRS7 conjugado con 6 moléculas de pro-2-PDox por anticuerpo (no mostrado). Se concluye que la conjugación de pro-2-PDox a anticuerpos no afecta la actividad de unión antígeno-anticuerpo.

55 [0271] Estabilidad del suero: La estabilidad del suero del ADC anti-Trop-2 (hRS7-pro-2-PDox) se determinó mediante incubación en suero humano a una concentración de 0,2 mg/mL a 37 °C. El incubado se analizó por HPLC usando cromatografía de interacción hidrofóbica de butilo (HIC). El análisis mostró que no hubo liberación de fármaco libre del conjugado, lo que sugiere una alta estabilidad sérica del conjugado. Cuando se repitió el mismo experimento con el conjugado de hRS7-doxorrubicina, que contenía el mismo enlazador escindible que hRS7-pro-2-PDox, y donde se verificó de forma independiente que el fármaco libre se liberaba con una vida media de 96 h, se observó una clara formación de un se observó el pico correspondiente a la doxorrubicina libre en HIC HPLC.

60 [0272] Sorprendentemente, se determinó que el conjugado de pro-2-PDox se sujetaba firmemente al anticuerpo porque entrecruzaba las cadenas peptídicas del anticuerpo. El entrecruzamiento estabiliza la unión del fármaco al anticuerpo para que el fármaco solo se libere intracelularmente después de que se haya metabolizado el anticuerpo.

El entrecruzamiento ayuda a minimizar la toxicidad, por ejemplo, la cardiotoxicidad, que resultaría de la liberación del fármaco libre en circulación. El uso anterior de conjugados peptídicos 2-PDox fracasó porque el fármaco entrecruzaba el péptido con otras proteínas o péptidos *in vivo*. Con el presente anti-Trop-2 ADC, el pro-2-PDox se une a grupos disulfuro tiol intercatenarios mientras está en forma de profármaco. La protección del profármaco se elimina rápidamente *in vivo* poco después de la inyección y la porción 2-PDox resultante del conjugado entrecruza las cadenas peptídicas del anticuerpo, formando un entrecruzamiento intramolecular dentro de la molécula del anticuerpo. Esto estabiliza el ADC y evita el entrecruzamiento con otras moléculas en circulación.

[0273] Estudios preclínicos *in vivo*: El tamaño del tumor se determinó mediante mediciones con calibre de longitud (L) y ancho (W) con el volumen del tumor calculado como $(L \times W^2)/2$. Se midieron los tumores y se pesaron los ratones dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron si sus tumores alcanzaban un tamaño $> 1 \text{ cm}^3$, perdían más del 15 % de su peso corporal inicial o se volvían moribundos de otro modo. El análisis estadístico de los datos de crecimiento tumoral se basó en el área bajo la curva (AUC) y el tiempo de supervivencia. Los perfiles de crecimiento tumoral individual se obtuvieron a través de modelos 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. Se utilizó una prueba *t* de dos colas para evaluar la significación estadística entre todos los diversos grupos de tratamiento y los controles no específicos. Para el análisis de control de solución salina, se usó una prueba *t* de una cola para evaluar la significación. Los estudios de supervivencia se analizaron mediante diagramas de Kaplan-Meier (log-rank), utilizando el paquete de software Prism GraphPad Software (v4.03) (Advanced Graphics Software, Inc.; Encinitas, CA). Todas las dosis en los experimentos preclínicos se expresan en cantidades de anticuerpos. En términos de fármaco, 100 μg de anticuerpo (5 mg/kg) en un ratón de 20 g, por ejemplo, lleva 1,4 μg -2,8 μg (0,14-0,17 mg/kg) de dosis equivalente de pro-2-PDox cuando se utiliza un ADC con 3-6 fármacos/IgG.

[0274] Una sola dosis i.v. de $\geq 300 \mu\text{g}$ [$\sim 10 \mu\text{g}$ de pro-2-PDox] del ADC anti-Trop-2 fue letal, pero todos los animales toleraron 4 dosis de 45 μg administradas en 2 semanas. Usando este régimen de dosificación, examinamos el efecto terapéutico de anti-Trop-2 hRS7-pro-2-PDox en 2 modelos de xenoinjerto de tumor humano, Capan-1 (cáncer de páncreas) y NCI-N87 (cáncer gástrico). La terapia comenzó 7 días después del trasplante del tumor en ratones desnudos. En el modelo Capan-1 establecido de 7 días de edad, el 100 % de los tumores establecidos retrocedieron rápidamente, sin evidencia de nuevo crecimiento (no mostrado). Este resultado se reprodujo en un experimento repetido (no mostrado). El conjugado anti-Trop-2 de pro-2-PDox fue mucho más efectivo que el mismo fármaco conjugado con un anticuerpo (hMN-14) contra CEACAM5, que también se expresa en el cáncer de páncreas, o un anticuerpo contra CD20 (hA20), lo cual no es. Todos los tratamientos fueron superiores al control de solución salina.

[0275] Se observaron resultados similares en el modelo NCI-N87 establecido (no mostrado), donde un segundo curso de terapia, administrado después del día 70, se toleró con seguridad y condujo a regresiones adicionales del tumor residual (no mostrado). El conjugado de hRS7-SN-38 internalizado, dirigido a Trop-2, proporcionó mejores respuestas terapéuticas que un conjugado de un anticuerpo anti-CEACAM5 de internalización deficiente, hMN-14 (no mostrado). Un ADC anti-CD20 no dirigido, hA20-pro-2-PDox, fue ineficaz, lo que indica una eficacia terapéutica selectiva (no se muestra). Los datos de un xenoinjerto de cáncer de mama (MDA-MB-468) y un segundo xenoinjerto de cáncer de páncreas (no mostrado) mostraron el mismo patrón, con el ADC anti-Trop-2 significativamente más eficaz en comparación con el ADC no dirigido o el control de solución salina. En ambos casos, la administración de ADC anti-Trop-2 produjo una clara inhibición del crecimiento tumoral hasta el final del estudio.

[0276] PK y toxicidad de hRS7-pro-2-PDox con sustituciones de 6,8 o 3,7 fármaco/IgG - Se sabe que los conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC) que contienen hasta 8 fármacos ultratóxicos/MAb se eliminan más rápido que los MAb no modificados y aumentan la eliminación. toxicidad diana, hallazgo que ha llevado a las tendencias actuales de uso de sustituciones de fármacos de ≤ 4 (Hamblett et al., 2004, Clin Cancer Res 10:7063-70). Los ADC se prepararon y evaluaron con proporciones medias de sustitución de fármaco/MAb (MSR) de $\sim 6:1$ y $\sim 3:1$. Se administraron grupos de ratones normales ($n = 5$), i.v., dosis únicas de hRS7 o hRS7-pro-2-PDox sin modificar con sustitución de fármaco de 6,8 o 3,7 (misma dosis de proteína), y se recogieron muestras de suero a los 30 min, 4 h, 24 h, 72 h y 168 h después de la inyección. Estos fueron analizados por ELISA para determinar la concentración de anticuerpos. No hubo diferencias significativas en las concentraciones séricas en varios momentos, lo que indica que estos mostraron una eliminación similar de la sangre. Los parámetros farmacocinéticos (Cmax, AUC, etc.) también fueron similares. Los ADC con mayor o menor sustitución de fármaco tuvieron una tolerabilidad similar en ratones desnudos, cuando se administraron a la misma dosis de fármaco conjugado.

[0277] Eficacia terapéutica a la dosis mínima efectiva (MED) - Anti-Trop-2 ADC (hRS7-pro-2-PDox), se evaluó en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87 mediante la administración de una dosis única de proteína en bolo de 9 mg/ kg, 6,75 mg/kg, 4,5 mg/kg, 2,25 mg/kg o 1 mg/kg. La terapia se inició cuando el volumen tumoral medio (mTV) fue de $0,256 \text{ cm}^3$. El día 21, el mTV en el grupo de control de solución salina (grupo sin tratamiento) fue de $0,801 \pm 0,181 \text{ cm}^3$, que fue significativamente mayor que el de los ratones tratados con una dosis de 9, 6,75, 4,5 o 2,25 mg/kg con un mTV de $0,211 \pm 0,042 \text{ cm}^3$, $0,239 \pm 0,054 \text{ cm}^3$, $0,264 \pm 0,087 \text{ cm}^3$, y $0,567 \pm 0,179 \text{ cm}^3$, respectivamente ($P < 0,0047$, prueba *t* de una cola). A partir de estos, la dosis efectiva mínima se estimó en 2,25 mg/kg, mientras que 9 mg/kg representaban MTD.

Ejemplo 11. ADC anti-Trop-2 que comprende hRS7 y Paclitaxel

[0278] Se preparó un nuevo conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) conjugando paclitaxel (TAXOL®) con el anticuerpo antitrop-2 humano hRS7 (hRS7-paclitaxel). El producto final tenía una proporción media de sustitución de fármaco a anticuerpo de 2,2. Este ADC se probó *in vitro* usando dos líneas celulares positivas para Trop-2 diferentes como dianas: BxPC-3 (adenocarcinoma pancreático humano) y MDA-MB-468 (carcinoma de mama triple negativo humano). Un día antes de añadir el ADC, se recogieron células del cultivo de tejidos y se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 2000 células por pocillo. Al día siguiente, las células se expusieron a paclitaxel libre ($6,1 \times 10^{-11}$ a 4×10^{-6} M) o el fármaco equivalente de hRS7-paclitaxel. A modo de comparación, hRS7-SN-38 y SN-38 libre también se probaron en un rango de $3,84 \times 10^{-12}$ a $2,5 \times 10^{-7}$ M. Las placas se incubaron a 37 °C durante 96 h. Después de este período de incubación, se añadió un sustrato MTS a todas las placas y se leyó el desarrollo del color a intervalos de media hora hasta que los pocillos de control no tratados tuvieran una lectura de DO_{492nm} de aproximadamente 1,0. La inhibición del crecimiento se midió como un porcentaje de crecimiento en relación con las células no tratadas utilizando el software Microsoft Excel y Prism (regresión no lineal para generar curvas de respuesta a la dosis sigmoides que producen valores de Cl₅₀).

[0279] El ADC hRS7-paclitaxel exhibió actividad citotóxica en la línea celular de mama MDA-MB-468 (no mostrada), con un valor Cl₅₀ aproximadamente 4,5 veces mayor que hRS7-SN-38. El paclitaxel libre era mucho más potente que el SN-38 libre (no mostrado). Mientras que la Cl₅₀ para SN-38 libre fue de $1,54 \times 10^{-9}$ M, la Cl₅₀ para paclitaxel libre fue inferior a $6,1 \times 10^{-11}$ M. Se obtuvieron resultados similares para la línea celular pancreática BxPC-3 (no mostrada) en el que el ADC hRS7-paclitaxel tenía un valor Cl₅₀ aproximadamente 2,8 veces mayor que el ADC hRS7-SN-38. Estos resultados muestran la eficacia del paclitaxel conjugado anti-Trop-2 *in vitro*, con valores de Cl₅₀ en el rango nanomolar, similares al ADC hRS7-SN-38.

Ejemplo 12. Citotoxicidad de Anti-Trop-2 ADC (MAB650-SN-38)

[0280] Se fabricó un ADC anti-Trop-2 novedoso con SN-38 y MAB650, lo que arrojó una proporción media de sustitución de fármaco por anticuerpo de 6,89. Se realizaron ensayos de citotoxicidad para comparar los ADC MAB650-SN-38 y hRS7-SN-38 usando dos líneas celulares de adenocarcinoma pancreático humano diferentes (BxPC-3 y Capan-1) y una línea celular de carcinoma de mama triple negativo humano (MDA-MB-468) como objetivos.

[0281] Un día antes de añadir los ADC, las células se recogieron del cultivo de tejidos y se sembraron en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, las células se expusieron a hRS7-SN-38, MAB650-SN-38 y SN-38 libre en un rango de fármaco de $3,84 \times 10^{-12}$ a $2,5 \times 10^{-7}$ M. Se usó MAB650 no conjugado como control en dosis equivalentes de proteína como el MAB650-SN-38. Las placas se incubaron a 37°C durante 96 h. Después de este período de incubación, se añadió un sustrato MTS a todas las placas y se leyó el desarrollo del color a intervalos de media hora hasta que se alcanzó una DO_{492nm} de aproximadamente 1,0 para las células no tratadas. La inhibición del crecimiento se midió como un porcentaje de crecimiento en relación con las células no tratadas utilizando el software Microsoft Excel y Prism (regresión no lineal para generar curvas de respuesta a la dosis sigmoides que producen valores de Cl₅₀).

[0282] hRS7-SN-38 y MAB650-SN-38 tuvieron efectos inhibidores del crecimiento similares (no mostrados) con valores de Cl₅₀ en el rango bajo de nM que es típico para los SN-38-ADC en estas líneas celulares. En la línea celular de adenocarcinoma de páncreas humano Capan-1 (no mostrada), el ADC hRS7-SN-38 mostró un Cl₅₀ de 3,5 nM, en comparación con 4,1 nM para el ADC MAB650-SN-38 y 1,0 nM para el SN-38 libre. En la línea celular de adenocarcinoma pancreático BxPC-3 humana (no mostrada), el ADC hRS7-SN-38 mostró un Cl₅₀ de 2,6 nM, en comparación con 3,0 nM para el ADC MAB650-SN-38 y 1,0 nM para SN-38 libre. En la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano NCI-N87 (no mostrada), el ADC hRS7-SN-38 mostró un Cl₅₀ de 3,6 nM, en comparación con 4,1 nM para el ADC MAB650-SN-38 y 4,3 nM para el SN-38 libre.

[0283] En resumen, en estos ensayos *in vitro*, los conjugados SN-38 de dos anticuerpos anti-Trop-2, hRS7 y MAB650, mostraron eficacias iguales contra varias líneas de células tumorales, similar a la de SN-38 libre. Debido a que la función de direccionamiento de los anticuerpos anti-Trop-2 sería un factor mucho más significativo *in vivo* que *in vitro*, los datos respaldan que los ADC anti-Trop-2-SN-38 como clase serían altamente eficaces *in vivo*, como demostrado en los Ejemplos anteriores para hRS7-SN-38.

Ejemplo 13. Citotoxicidad de Anti-Trop-2 ADC (162-46.2-SN-38)

[0284] Se fabricó un nuevo ADC anti-Trop-2 con SN-38 y 162-46.2, lo que produjo una proporción de sustitución de fármaco por anticuerpo de 6,14. Se realizaron ensayos de citotoxicidad para comparar los ADC 162-46.2-SN-38 y hRS7-SN-38 usando dos líneas celulares positivas para Trop-2 diferentes como objetivos, el adenocarcinoma pancreático humano BxPC-3 y el carcinoma de mama negativo triple humano MDA-MB-468.

[0285] Un día antes de añadir el ADC, se recogieron células del cultivo de tejidos y se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 2000 células por pocillo. Al día siguiente, las células se expusieron a hRS7-SN-38, 162-46.2-SN-38 o SN-38 libre en un rango de fármaco de $3,84 \times 10^{-12}$ a $2,5 \times 10^{-7}$ M. 162-46.2 y hRS7 no conjugados se usaron

como controles a las mismas dosis equivalentes de proteína que 162-46.2-SN-38 y hRS7-SN-38, respectivamente. Las placas se incubaron a 37°C durante 96 h. Después de este período de incubación, se añadió un sustrato MTS a todas las placas y se leyó el desarrollo del color a intervalos de media hora hasta que los pocios de control no tratados tuvieran una lectura de DO_{492nm} de aproximadamente 1,0. La inhibición del crecimiento se midió como un porcentaje de crecimiento en relación con las células no tratadas utilizando el software Microsoft Excel y Prism (regresión no lineal para generar curvas de respuesta a la dosis sigmoides que producen valores de Cl_{50}).

[0286] El 162-46.2-SN-38 ADC tuvo valores Cl_{50} similares en comparación con hRS7-SN-38 (no mostrado). Cuando se ensayó contra la línea celular de adenocarcinoma de páncreas humano BxPC-3 (no se muestra), hRS7-SN-38 tenía un Cl_{50} de 5,8 nM, en comparación con 10,6 nM para 162-46.2-SN-38 y 1,6 nM para SN-38 libre. Cuando se ensayó contra la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-468 (no se muestra), hRS7-SN-38 tenía un Cl_{50} de 3,9 nM, en comparación con 6,1 nM para 162-46.2-SN-38 y 0,8 nM para SN-38 libre. Los anticuerpos libres solos mostraron poca citotoxicidad para cualquiera de las líneas celulares de cáncer positivas para Trop-2.

[0287] En resumen, al comparar las eficacias *in vitro* de tres anticuerpos anti-Trop-2 diferentes conjugados con el mismo fármaco citotóxico, los tres ADC exhibieron efectos citotóxicos equivalentes contra una variedad de líneas celulares de cáncer positivas para Trop-2. Estos datos respaldan que la clase de anticuerpos anti-Trop-2, incorporados en ADC conjugados con fármacos, son agentes terapéuticos anticancerígenos eficaces para tumores sólidos que expresan Trop-2.

Ejemplo 14. Ensayos clínicos con ADC anti-Trop-2 IMMU-132 que comprende anticuerpo hRS7 conjugado con SN-38

Resumen

[0288] El presente ejemplo informa los resultados de un ensayo clínico de fase I y una extensión de fase II en curso con IMMU-132, un ADC del anticuerpo anti-Trop-2 hRS7 humanizado que se internaliza conjugado con un enlazador sensible al pH a SN-38 (relación media de fármaco-anticuerpo = 7,6). Trop-2 es una proteína transmembrana de tipo I, transductora de calcio, expresada a alta densidad ($\sim 1 \times 10^5$), frecuencia y especificidad por muchos carcinomas humanos, con una expresión tisular normal limitada. Los estudios preclínicos en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de tumor pancreático humano Capan-1 han revelado que IMMU-132 es capaz de administrar hasta 120 veces más SN-38 a tumor que el derivado de una terapia con irinotecán tolerado al máximo.

[0289] El presente ejemplo informa sobre el ensayo de fase I inicial de 25 pacientes (pts) que habían fracasado en múltiples terapias previas (algunos incluidos los fármacos inhibidores de la topoisomerasa-I/II), y la extensión de fase II en curso que ahora informa sobre 69 pts, incluso en cáncer colorrectal (CRC), pulmón de células pequeñas y no pequeñas (SCLC, NSCLC, respectivamente), cáncer de mama triple negativo (TNBC), pancreático (PDC), esofágico y otros cánceres.

[0290] se detectó en suero, pero se expresó fuertemente ($\geq 2+$) en la mayoría de los tumores archivados. En un diseño de ensayo 3+3, IMMU-132 se administró los días 1 y 8 en ciclos repetidos de 21 días, comenzando con 8 mg/kg/dosis, luego 12 y 18 mg/kg antes de la neutropenia limitante de la dosis. Para optimizar el tratamiento acumulativo con retrasos mínimos, la fase II se centra en 8 y 10 mg/kg (n=30 y 14, respectivamente). En 49 pts que informaron EA relacionados en este momento, se produjo neutropenia $\geq G3$ en el 28 % (4 % G4). Las toxicidades no hematológicas más comunes inicialmente en estos pacientes han sido fatiga (55 %; $\geq G3 = 9 %$), náuseas (53 %; $\geq G3 = 0 %$), diarrea (47 %; $\geq G3 = 9 %$), alopecia (40%) y vómitos (32%; $\geq G3 = 2 %$). Se encontró homocigosis UGT1A1 * 28/ * 28 en 6 pacientes, 2 de los cuales tenían toxicidades hematológicas y gastrointestinales más graves. En la Fase I y las fases de expansión, ahora hay 48 pts (excluyendo PDC) que son evaluables por RECIST/CT para la mejor respuesta. Siete (15 %) de los pacientes tuvieron una respuesta parcial (RP), incluidos pacientes con CCR (N = 1), TNBC (N = 2), SCLC (N = 2), NSCLC (N = 1) y cánceres de esófago (N = 1), y otros 27 pts (56%) tenían enfermedad estable (DE), para un total de 38 pts (79%) con respuesta a la enfermedad; 8 de 13 pacientes con PDC evaluables por TC (62 %) tenían SD, con una mediana de tiempo hasta la progresión (TTP) de 12,7 semanas en comparación con 8,0 semanas en su última terapia anterior. El TTP para los 48 pts restantes es de más de 12,6 semanas (*rango de 6,0 a 51,4 semanas*). Plasma CEA y CA19-9 se correlacionaron con las respuestas. No se detectaron anticuerpos anti-hRS7 o antiSN-38 a pesar de la dosificación durante meses. El conjugado se eliminó del suero dentro de los 3 días, de acuerdo con los estudios en animales *in vivo* donde el 50 % del SN-38 se liberó diariamente, con $>95 %$ del SN-38 en el suero unido a la IgG en una forma no glucuronizada, y en concentraciones hasta 100 veces más altas que el SN-38 notificado en pacientes que recibieron irinotecán. Estos resultados muestran que el ADC que contiene hRS7-SN-38 es terapéuticamente activo en cánceres sólidos metastásicos, con diarrea y neutropenia manejables.

Farmacocinética

[0291] Se usaron dos métodos ELISA para medir el aclaramiento de IgG (captura con anticuerpo anti-idiotípico hRS7) y el conjugado intacto (captura con anti-SN-38 IgG/sonda con anticuerpo anti-idiotípico anti-hRS7). SN-38 se midió por HPLC. La fracción total de IMMU-132 (conjugado intacto) se eliminó más rápidamente que la IgG (no se muestra), lo

que refleja la liberación gradual conocida de SN-38 del conjugado. La determinación por HPLC de SN-38 (sin unir y TOTAL) mostró que >95 % de SN-38 en el suero estaba unido a la IgG. Las bajas concentraciones de SN-38G sugieren que el SN-38 unido a la IgG está protegido de la glucuronidación. La comparación de ELISA para conjugado y SN-38 HPLC reveló que ambos se superponen, lo que sugiere que ELISA es un sustituto para monitorear la eliminación de SN-38.

[0292] En la **Tabla 12** se proporciona un resumen del régimen de dosificación y la encuesta del paciente.

Tabla 12. Parámetros del ensayo clínico

Régimen de dosificación	Una vez por semana durante 2 semanas administrada cada 21 días hasta 8 ciclos. En la inscripción inicial, la dosis planificada se retrasó y se redujo si la toxicidad relacionada con el tratamiento era \geq G2; el protocolo se modificó para retrasar y reducir la dosis solo en caso de toxicidad \geq G3.
Cohortes de nivel de dosis	8, 12, 18 mg/kg; luego se redujo a un nivel de dosis intermedia de 10 mg/kg.
Tamaño de la cohorte	Diseño estándar Fase I [3+3]; la expansión incluye 15 pacientes en cánceres selectos.
DLT	G4 ANC \geq 7 días; neutropenia febril \geq G3 de cualquier duración; G4 Pit \geq 5 d; G4 Hgb; Grado 4 N/V/D cualquier duración/G3 N/V/D durante $>$ 48 h; reacciones relacionadas con la perfusión G3; toxicidad no hematológica relacionada \geq G3.
Dosis Máxima Aceptable (MAD)	Dosis máxima donde \geq 2/6 pacientes toleran el 1er ciclo de 21 días sin demora o reducción o \geq toxicidad G3.
Pacientes	Colorrectal, páncreas, gástrico, esofágico, pulmón (NSCLC, SCLC), mama triple negativa (TNBC), próstata, ovario, riñón, vejiga urinaria, cabeza/cuello, hepatocelular metastásico. Refractorio/recidivante después de los regímenes de tratamiento estándar para el cáncer metastásico. <u>NO</u> se requiere terapia previa que contenga irinotecán para la inscripción. Sin lesión voluminosa $>$ 5 cm. Debe haber 4 semanas después de cualquier cirugía mayor y 2 semanas después del régimen de radiación o quimioterapia. Se excluyen la enfermedad de Gilbert o la enfermedad metastásica del SNC conocida.

Estado del ensayo clínico

[0293] Se informó un total de 69 pacientes (incluidos 25 pacientes en Fase I) con diversos cánceres metastásicos que tenían una mediana de 3 terapias previas. Ocho pacientes tuvieron progresión clínica y se retiraron antes de la evaluación por TC. Trece pacientes con cáncer de páncreas evaluable por CT se informaron por separado. La mediana de TTP (tiempo hasta la progresión) en pacientes con PDC fue de 11,9 semanas (rango de 2 a 21,4 semanas) en comparación con la mediana de 8 semanas de TTP para la última terapia anterior.

[0294] Un total de 48 pacientes con diversos tipos de cáncer tuvieron al menos 1 evaluación por TC a partir de la cual se determinaron la mejor respuesta (no se muestra) y el tiempo hasta la progresión (TTP; no se muestra). Para resumir los datos de Best Response, de 8 pacientes evaluables con TNBC (cáncer de mama triple negativo), hubo 2 PR (respuesta parcial), 4 SD (enfermedad estable) y 2 PD (enfermedad progresiva) para una respuesta total [PR + DE] de 6/8 (75%). Para SCLC (cáncer de pulmón de células pequeñas), de 4 pacientes evaluables hubo 2 PR, 0 SD y 2 PD para una respuesta total de 2/4 (50%). Para CCR (cáncer colorrectal), de 18 pacientes evaluables hubo 1 PR, 11 SD y 6 PD para una respuesta total de 12/18 (67%). Para el cáncer de esófago, de 4 pacientes evaluables hubo 1 PR, 2 SD y 1 PD para una respuesta total de 3/4 (75%). Para NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), de 5 pacientes evaluables hubo 1 PR, 3 SD y 1 PD para una respuesta total de 4/5 (80%). Sobre todos los pacientes tratados, de 48 pacientes evaluables hubo 7 PR, 27 SD y 14 PD para una respuesta total de 34/48 (71%). Estos resultados demuestran que el ADC anti-TROP-2 (hRS7-SN-38) mostró una eficacia clínica significativa contra una amplia gama de tumores sólidos en pacientes humanos.

[0295] Los efectos secundarios informados de la terapia (eventos adversos) se resumen en la **Tabla 13**. Como se desprende de los datos de la **Tabla 13**, la eficacia terapéutica de hRS7-SN-38 se logró a dosis de ADC que mostraron un nivel aceptablemente bajo de efectos secundarios adversos.

Tabla 13.

Listado de eventos adversos relacionados para IMMU-132-01				
Criterios: Total \geq 10% o \geq Grado 3				
N = 47 pacientes				
	TOTAL	Grado 3	Grado 4	
5	Fatiga	55%	4 (9%)	0
10	Náuseas	53%	0	0
15	Diarrea	47%	4 (9%)	0
20	Neutropenia	43%	11 (24%)	2 (4%)
25	Alopecia	40%	--	--
30	Vómitos	32%	1 (2%)	0
35	Anemia	13%	2 (4%)	0
40	Disgeusia	15%	0	0
45	Pirexia	13%	0	0
50	Dolor abdominal	11%	0	0
55	Hipopotasemia	11%	1 (2%)	0
60	Disminución de glóbulos blancos	6%	1 (2%)	0
	Neutropenia febril	6%	1 (2%)	2 (4%)
	Trombosis venosa profunda	2%	1 (2%)	0
	Calificación por CTCAE v 4.0			

[0296] Las respuestas parciales ejemplares al ADC anti-Trop-2 se confirmaron mediante datos de TC (no mostrados). Como RP ejemplar en CCR, una mujer de 62 años diagnosticada por primera vez con CCR se sometió a una hemicolectomía primaria. Cuatro meses después, se sometió a una resección hepática por metástasis hepáticas y recibió 7 meses de tratamiento con FOLFOX y 1 mes de 5FU. Presentó múltiples lesiones principalmente en el hígado (3+ Trop-2 por inmunohistología), ingresando al ensayo hRS7-SN-38 con una dosis inicial de 8 mg/kg aproximadamente 1 año después del diagnóstico inicial. En su primera evaluación por TC, se logró una RP, con una reducción del 37 % en las lesiones diana (no se muestra). El paciente continuó el tratamiento, logrando una reducción máxima de 65% de disminución después de 10 meses de tratamiento (no se muestra) con disminución de CEA de 781 ng/ml a 26,5 ng/ml, antes de progresar 3 meses más tarde.

[0297] Como PR ejemplar en NSCLC, un hombre de 65 años fue diagnosticado con NSCLC en estadio IIIB (células cuadradas). El tratamiento inicial de carboplatino/etopósido (3 meses) junto con 7000 cGy XRT resultó en una respuesta que duró 10 meses. A continuación, comenzó con la terapia de mantenimiento Tarceva, que continuó hasta que se consideró para el ensayo IMMU-132, además de someterse a una laminectomía lumbar. Recibió primera dosis de IMMU-132 después de 5 meses de Tarceva, presentando en ese momento lesión de 5,6 cm en pulmón derecho con abundante derrame pleural. Acababa de completar su sexta dosis dos meses después cuando la primera TC mostró que la lesión diana primaria se había reducido a 3,2 cm (no se muestra).

[0298] Como PR ejemplar en SCLC, una mujer de 65 años fue diagnosticada con SCLC pobremente diferenciado. Despues de recibir carboplatino/etopósido (inhibidor de Topo-II) que finalizó a los 2 meses sin respuesta, seguido de topotecán (inhibidor de Topo-I) que finalizó a los 2 meses, también sin respuesta, recibió XRT local (3000 cGy) que finalizó 1 mes después. Sin embargo, al mes siguiente la progresión había continuado. El paciente comenzó con IMMU-132 al mes siguiente (12 mg/kg; reducido a 6,8 mg/kg; expresión de Trop-2 3+), y después de dos meses de IMMU-132, una reducción del 38 % en las lesiones diana, incluida una se produjo una reducción sustancial de la lesión pulmonar principal (no mostrada). El paciente progresó 3 meses después de recibir 12 dosis.

[0299] Estos resultados son significativos porque demuestran que el ADC anti-Trop-2 fue eficaz, incluso en pacientes que habían fracasado o progresado después de múltiples terapias previas.

[0300] En conclusión, a las dosis utilizadas, la toxicidad principal fue una neutropenia manejable, con pocas toxicidades de grado 3. IMMU-132 mostró evidencia de actividad (PR y SD duradero) en pacientes recidivantes/refractarios con cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal y cáncer de esófago, incluidos pacientes con antecedentes de recaída en terapia con inhibidores de la topoisomerasa-I. Estos resultados muestran la eficacia del ADC anti-Trop-2 en una amplia gama de cánceres que son resistentes a las terapias existentes.

Ejemplo 15. Anti-CD22 (epratuzumab) SN-38 conjugado para la terapia de malignidades hematológicas

Resumen

[0301] Anteriormente descubrimos que los anticuerpos de internalización lenta conjugados con SN-38 podrían usarse con éxito cuando se preparan con un enlazador que permite que aproximadamente el 50 % del SN-38 unido a IgG se disocie en el suero cada 24 horas. En este estudio, se examinó la eficacia de los conjugados SN-38 preparados con epratuzumab (de internalización rápida) y veltuzumab (de internalización lenta), IgG anti-CD22 y anti-CD20 humanizados, respectivamente, para el tratamiento de tumores malignos de células B. Ambos conjugados de anticuerpo y fármaco tenían una actividad nanomolar similar contra una variedad de líneas celulares de linfoma/leucemia humana, pero la liberación lenta de SN-38 comprometía la discriminación de potencia *in vitro* incluso contra un conjugado irrelevante. Cuando SN-38 se unió de manera estable al conjugado anti-CD22, su potencia se redujo de 40 a 55 veces. Por lo tanto, se realizaron estudios adicionales solo con el conector menos estable que se disocia lentamente. *In vivo*, se encontró una actividad antitumoral similar entre CD22 y el conjugado de anticuerpo-fármaco CD20 en ratones con xenoinjertos de Ramos, aunque Ramos expresó 15 veces más CD20 que CD22, lo que sugiere que la internalización del conjugado epratuzumab-SN-38 (Emab-SN-38) potenció su actividad. Emab-SN-38 fue más eficaz que un conjugado IgG-SN-38 irrelevante que no se une *in vivo*, eliminando la mayoría de los xenoinjertos de Ramos bien establecidos en dosis no tóxicas. Los estudios *in vitro* e *in vivo* mostraron que Emab-SN-38 podría combinarse con veltuzumab no conjugado para un tratamiento más eficaz. Por lo tanto, Emab-SN-38 es activo en el linfoma y la 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 la terapia con anticuerpos anti-CD20. (Sharkey et al., 2011, Mol Cancer Ther 11:224-34).

20 *Introducción*

[0302] Un esfuerzo significativo se ha centrado en la terapia biológica de la leucemia y el linfoma, donde se recibieron anticuerpos no conjugados (p. ej., rituximab, alemtuzumab, ofatumumab), radioinmunconjungados (⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan, ¹³¹I-tositumomab) y un fármaco conjugado (gemtuzumab ozogamicina). Aprobación de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). Otro conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC), brentuximab vedotin (SGN-35; anti-CD30-auristatin E), recibió recientemente la aprobación acelerada de la FDA para el linfoma de Hodgkin y los linfomas anaplásicos de células grandes. También hay una serie de otros ADC en desarrollo preclínico y clínico que se dirigen a CD19, CD22, CD37, CD74 y CD79b.

[0303] Los anticuerpos contra todos estos objetivos son opciones lógicas para los portadores de fármacos, porque se internalizan. La internalización y la especificidad de CD22 lo han convertido en un objetivo particularmente importante para la leucemia y los linfomas, con al menos 3 conjugados anti-CD22 diferentes en investigación clínica, incluido CMC-544 (calicheamicina conjugada labil en ácido), un conjugado anti-CD22-maitansina (MCC-DM1 unido de forma estable) y CAT-3888 (formalmente BL22; una proteína de fusión de cadena sencilla de exotoxina de *Pseudomonas*). El agente activo en todos estos conjugados tiene una potencia subnanomolar (es decir, los llamados ultratóxicos).

[0304] Recientemente desarrollamos métodos para conjugar anticuerpos con SN-38, un inhibidor de la topoisomerasa I con potencia nanomolar baja que se deriva 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 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 retuvieron la unión a CEACAM5 pero diferían en la tasa de disociación de SN-38 en suero humano, con vidas medias que variaban de aproximadamente 10 a 67 horas (Govindan et al., 2009, Clin Cancer Res 15:6052-62). Finalmente, se seleccionó el enlazador denominado CL2, con estabilidad intermedia (~ 50 % disociado en 24-35 horas), para un mayor desarrollo. CL2 se modificó recientemente, eliminando la fenilalanina en el dipéptido escindible de catespsina B para simplificar y mejorar los rendimientos de fabricación. El nuevo derivado, denominado CL2A, retiene el enlace de carbonato sensible al pH con el SN-38, pero ya no es escindido selectivamente por la catespsina B. Sin embargo, tiene una estabilidad sérica idéntica y una actividad *in vivo* mejorada en comparación con el enlazador CL2 original (Cardillo et al., 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69). Debido a que se encontró una eficacia significativa sin toxicidad con el antiCEACAM5-SN-38 de internalización lenta, postulamos que su actividad se vio favorecida por la liberación lenta de SN-38 del anticuerpo después de que se localizó en un tumor. Por lo tanto, el objetivo principal de este informe fue evaluar las perspectivas terapéuticas de los conjugados preparados con el enlazador CL2A con dos anticuerpos que son altamente específicos para los cánceres de células B pero difieren en sus propiedades de internalización y expresión de antígenos.

[0305] Epratuzumab (Emab) es un anti-CD22 IgG1 humanizado de internalización rápida (p. ej., ≥ 50 % en 1 hora) que se ha evaluado ampliamente en linfoma y leucemia en forma no conjugada o conjugada. Veltuzumab (Vmab) es un anticuerpo anti-CD20 humanizado que también se está estudiando clínicamente pero se internaliza lentamente (p. ej., ~10 % en 1 hora). El CD20 generalmente se expresa a niveles mucho más altos que el CD22 en el linfoma no Hodgkin, mientras que el CD22 se expresa preferentemente en la leucemia linfoblástica aguda (LLA), pero no en el mieloma múltiple. Ambos anticuerpos son efectivos 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). Sobre la base de estudios previos que mostraron que ⁹⁰Y-Emab combinado con veltuzumab no conjugado tenía mayor eficacia en modelos de NHL (Mattes et al., 2008, Clin Cancer Res 14:6154-60), también examinamos el Emab-SN-38 + combinación de Vmab,

ya que esto podría proporcionar un beneficio adicional sin competir por el mismo antígeno diana o tener toxicidad adicional.

Materiales y métodos

- 5 [0306] Líneas celulares. Ramos, Raji, Daudi (linfomas de Burkitt) y JeKo-1 (linfoma de células del manto) se adquirieron de la American Type Culture Collection. REH, RS4;11, MN-60 y 697 (ALL) se adquirieron de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. WSU-FSCCL (NHL folicular) fue un regalo del Dr. Mitchell R. Smith (Fox Chase Cancer Center, Filadelfia, PA). Todas las líneas celulares se cultivaron en una incubadora con CO₂ humidificado (5 %) a 37 °C en medios suplementados recomendados que contenían entre un 10 y un 20 % de suero de ternera fetal y se controlaron periódicamente para Mycoplasma.
- 10 [0307] Anticuerpos y métodos de conjugación. Epratuzumab y veltuzumab son anticuerpos monoclonales IgG1 anti-CD22 y anti-CD20 humanizados, respectivamente. Labetuzumab (Lmab), un IgG1 anti-CEACAM5 humanizado, y RS7, un anticuerpo anti-Trop-2 humanizado (ambos de Immunomedics, Inc.), se usaron como controles irrelevantes no vinculantes. En este documento, Emab-SN-38, Vmab-SN-38 y Lmab-SN-38 se refieren a conjugados preparados usando el enlazador CL2A que se describió anteriormente. Los estudios *in vitro* en suero humano mostraron que aproximadamente el 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, es estable en suero humano durante 14 días, pero contiene un sitio de escisión de catepsina 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 dan en los ejemplos anteriores. Los conjugados contenían aproximadamente 6 unidades de SN-38 por IgG (p. ej., 1,0 mg del conjugado de IgG-SN-38 contiene ~16 µg de SN-38).
- 15 [0308] Unión celular y citotoxicidad *in vitro*. La citometría de flujo se llevó a cabo usando los anticuerpos irrelevantes y específicos no conjugados incubados durante 1 hora a 4 °C, y la unión se reveló usando IgG anti-humana de cabra específico al fragmento (FITC)-Fcγ de isotiocianato de fluoresceína (Jackson ImmunoResearch), también incubados durante 1 hora a 4°C. La mediana de la fluorescencia se determinó en un citómetro de flujo FACSCALIBUR® (Becton Dickinson) usando un paquete de software CellQuest.
- 20 [0309] La citotoxicidad se determinó utilizando el ensayo de reducción de colorante MTS (Promega). Curvas de dosis-respuesta [con/sin Fcγ F(ab')₂ antihumano de cabra; Jackson ImmunoResearch] se generaron a partir de la media de determinaciones por triplicado, y los valores de CI₅₀ se calcularon utilizando el software PRISM® GraphPad (v5), con comparaciones estadísticas utilizando una prueba F en las curvas de mejor ajuste para los datos. La significación se fijó en P < 0,05.
- 25 [0310] Inmunotransferencia. Después de 24 o 48 horas de exposición a los agentes de prueba, los marcadores de apoptosis temprana (expresión de p21) y tardía (escisión de PARP) se revelaron mediante transferencia de Western.
- 30 [0311] Estudios *in vivo*. El modelo Ramos subcutáneo se inició implantando 1 x 10⁷ células (0,2 ml) de cultivo (>95 % de viabilidad) en ratones desnudos hembra de 4 a 6 semanas de edad (Taconic). Tres semanas después de la implantación, los animales con tumores que oscilaban entre 0,4 y 0,8 cm³ (medidos con calibre, L x W x D) se segregaron en grupos de animales, cada uno con el mismo rango de tamaños de tumor. El tamaño del tumor y los pesos corporales se midieron al menos una vez por semana, y los animales se retiraron del estudio cuando los tumores crecieron hasta 3,0 cm³ o si experimentaron una pérdida de peso corporal del 20% o más. Los modelos WSU-FSCCL y 697 se iniciaron mediante inyección intravenosa de 2,5 x 10⁶ y 1 x 10⁷ células, respectivamente, en mujeres con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) ratones (Taconic). El tratamiento comenzó 5 días después de la administración de las células WSU-FSCCL y 7 días después de la inoculación 697. Los animales se observaron diariamente, usando parálisis de las patas traseras u otros signos de morbilidad como puntos finales de supervivencia sustitutos. Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal en ≤ 0,2 ml. Las dosis específicas y la frecuencia se dan en la sección de Resultados. Debido a que los ratones convierten el irinotecán en SN-38 de manera eficiente, la dosis de irinotecán se ajustó sobre la base de los 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.
- 35 [0312] La eficacia se expresó en una curva de Kaplan-Meier, utilizando el tiempo hasta la progresión (TTP) como criterios de valoración de supervivencia alternativos, como se indicó anteriormente. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de rango logarítmico utilizando el software PRISM® GraphPad (significación, P < 0,05).

Resultados

- 40 [0313] Expresión de antígenos y citotoxicidad *in vitro*. Todas las líneas celulares fueron altamente susceptibles a SN-38, con valores de CE₅₀ que oscilaron entre 0,13 nmol/L para Daudi y 2,28 nmol/l para RS4;11 (**Tabla 14**). Con la excepción de 697 y RS4;11, el conjugado anti-CD22 de Emab-SN-38 fue de 2 a 7 veces menos efectivo que SN-38. Este es un hallazgo común con nuestros conjugados SN-38 dirigidos, así como con otros no dirigidos. A pesar de las diferencias en la expresión del antígeno, Emab-SN-38 y Vmab-SN-38 tenían potencias similares a las del conjugado

Lmab-SN-38 anti-CEACAM5 que no se une, lo que probablemente se debió a la disociación de aproximadamente el 90% de SN-38 durante el ensayo MTS de 4 días. Otros procedimientos *in vitro* que utilizaron tiempos de exposición más cortos también fueron ineficaces para discriminar las diferencias en las potencias 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). También se examinó la regulación al alza de la escisión de p21 y PARP como marcadores tempranos y tardíos de apoptosis, respectivamente. Ramos no expresó p21. Sin embargo, se detectó la escisión de PARP, pero solo después de una exposición de 48 horas, y se expresó más fuertemente en las 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 PARP fueron evidentes hasta 48 horas después de la exposición a Emab-SN-38. Sin embargo, ambos se observaron después de una exposición de 24 horas con SN-38 libre (no se muestra). Si bien la mayor intensidad y la activación más temprana de los eventos apoptóticos con SN-38 libre son consistentes con su menor CE₅₀ sobre la forma conjugada con 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.

15

Tabla 14. Expresión de CD20 y CD22 por FACScan y citotoxicidad *in vitro* por ensayo MTS de SN-38 y Emab anti-CD22-SN-38, Vmab anti-CD20-SN-38 y Lmab anti-CEACAM5-SN-38 específicos conjuga contra varias líneas de células tumorales hematopoyéticas

Línea celular	Expresión de CD20	Expresión de CD22	Fluorescencia mediana (fondo)	Fluorescencia mediana (fondo)	SN-38, nmol/l	95%IC	Embab-SN-38, nmol/l	95%IC	Embab-SN-38, nmol/l	95%IC	Embab-SN-38, nmol/l	95%IC	Lmab-38, nmol/l SN-	95%IC
NBL: Burkitt														
Raji	422,2 (6,8)	45,9 (6,8)		1,42		0,8-2,4	2,10		1,2-3,8	ND	-	ND	-	1,8-7,6
	Expresión de CD20	Expresión de CD22					4,61		2,2-9,5	4,88		2,7-9,0	3,73	
Línea celular	Fluorescencia mediana (fondo)	Fluorescencia mediana (fondo)	SN-38, nmol/l	95%IC	Embab-SN-38, nmol/l	95%IC	Embab-SN-38, nmol/l	95%IC	Embab-SN-38, nmol/l	95%IC	Embab-SN-38, nmol/l	95%IC	Lmab-38, nmol/l SN-	95%IC
Ramos	620,4 (4,1)	40,8 (4,1)	0,40		0,2-0,7	2,92	1,6-5,4	ND	-	ND	-	ND	-	-
Daudi	815,1 (5,9)	145,0 (5,9)	0,13		0,1-0,2	0,52	4,5-21,6	13,56	4,9-37,2	8,08		2,9-22,2		
LNH: folicular	WSUFSCL	97,4 (4,9)	7,7 (4,9)	0,50	0,3-1,0	0,68	0,4-1,1	ND	-	ND	-	ND	-	
NHL: célula del manto	1,05	0,8-1,4	0,83	0,6-1,1	1,17	0,8-1,7							ND	-
Jeko-1	LLA: célula B	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			
REH	697	12,3 (4,1)	22,9 (4,1)	0,47	0,3-0,9	1,22	0,8-1,9	ND	-	ND	-	ND	-	
RS4;11	21,5 (5,8)	6,9 (4,2)	16,0 (4,2)	2,23	1,3-3,9	2,67	1,7-3,7	ND	-	ND	-	ND	-	
MN-60		3,7 (4,1)	23,3 (4,1)	2,28	1,1-4,9	1,68	1,0-3,0	ND	-	ND	-	ND	-	

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; ND, no determinado. ^aCE₅₀ expresada como equivalentes molares de SN-38 en Emab-SN-38.

[0314] Nuevamente examinamos la escisión de PARP y la expresión de p21, esta vez en células tratadas con Emab-SN-38 + Vmab. Confirmando el estudio anterior en Ramos, la escisión de PARP ocurre primero solo después de una exposición de 48 horas al conjugado, sin cambios en la expresión en presencia de un anticuerpo de entrecruzamiento (no se muestra). La exposición a veltuzumab durante más de 48 horas no tuvo efecto sobre la escisión de PARP, pero la escisión fue fuerte dentro de las 24 horas cuando se agregó un anticuerpo de entrecruzamiento (no se muestra). Sin embargo, cuando se combinó veltuzumab solo (sin reticulante) con Emab-SN-38, se produjo la escisión de PARP después de una exposición de 24 horas (no se muestra), lo que indica que veltuzumab podría inducir un inicio más rápido de la apoptosis, incluso en ausencia de entrecruzamiento. La única diferencia notable en la línea celular WSU-FSCCL fue que la combinación mejoró mucho la expresión de p21 a las 48 horas (no se muestra), lo que nuevamente sugiere una aceleración de la inducción de apoptosis cuando veltuzumab se combina con el conjugado Emab-SN-38. El retraso en la inducción de apoptosis en WSU-FSCCL en comparación con Ramos probablemente se explica por la menor expresión de CD22 y CD20.

[0315] Los agentes ultratóxicos suelen utilizar conectores que son muy estables en el suero, ya que su liberación prematura aumentaría la toxicidad, pero estos conjugados deben internalizarse para que el fármaco se administre de manera óptima. Debido a 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 ligado 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 era aproximadamente 40 a 55 veces menos potente que el conjugado CL2A en 3 líneas celulares (no se muestra). Si bien faltaba especificidad con los conjugados CL2A, el Emab-CL2E-SN-38 fue consistentemente aproximadamente dos veces más potente que el conjugado Lmab-anti-CEACAM5-CL2E-SN-38 que no se une (no se muestra). Llegamos a la conclusión de que era poco probable que el conjugado ligado de forma más estable fuera apropiado para un conjugado de veltuzumab de internalización lenta y, por lo tanto, continuamos nuestra investigación solo con conjugados de SN-38 ligados a CL2A.

[0316] Debido a las limitaciones de los ensayos *in vitro*, la eficacia se evaluó en modelos de xenoinjertos. Como se indica en la **Tabla 14**, todas las líneas celulares de linfoma tienen una expresión mucho mayor 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 las pruebas *in vitro* revelaron la mayor sensibilidad a SN-38 (**Tabla 14**). Es probable que estas propiedades dificulten la evaluación de las diferencias en la actividad atribuida al conjugado SN-38 frente al anticuerpo no conjugado, en particular cuando el epratuzumab no conjugado no es un tratamiento eficaz en animales. Debido a que Ramos se había utilizado previamente para mostrar una ventaja al combinar ⁹⁰Y-Emab con veltuzumab (Matthes et al., 2008, Clin Cancer Res 14:6154-60), elegimos comenzar con una comparación de Emab-SN-38 y conjugados Vmab-SN-38 en la línea celular Burkitt humana Ramos. A pesar de que la citometría de flujo mostró una expresión 15 veces mayor de CD20 que de CD22, la inmunohistología de los xenoinjertos de Ramos mostró abundantes CD22 y CD20, con CD22 aparentemente expresado de manera más uniforme que CD20 (no se muestra).

[0317] Los xenoinjertos de Ramos en animales no tratados progresaron rápidamente, alcanzando el tamaño de terminación de 3,0 cm³ desde su tamaño inicial de 0,4 cm³ en 6 días (no se muestra), y como se informó anteriormente, ni veltuzumab ni epratuzumab afectaron apreciablemente la progresión de Ramos bien establecido. xenoinjertos (Sharkey et al., 2009, J Nucl Med 50:444-53). En consonancia con los hallazgos previos utilizando otros conjugados de SN-38, ninguno de los animales tratados con un régimen de tratamiento de 0,5 mg/dosis de 4 semanas, dos veces por semana, tuvo una pérdida de peso apreciable. Ambos conjugados fueron altamente efectivos para controlar el crecimiento tumoral, con un 80% o más de los animales sin evidencia de tumor al final del tratamiento de 4 semanas (**FIG. 12A-12D**). La dosis de 0,25 mg de Vmab-SN-38 controló mejor el crecimiento durante las primeras 4 semanas, pero a 0,5 mg se observó un control temprano del crecimiento similar para ambos conjugados. Por lo tanto, a pesar de una expresión 15 veces mayor de CD20 que de CD22, Emab-SN-38 se comparó favorablemente con Vmab-SN-38. Por lo tanto, los estudios restantes se centraron en Emab-SN-38 solo o en combinación con veltuzumab no conjugado.

[0318] Emab-SN-38 dosis-respuesta y especificidad. Se observó una relación dosis-respuesta para los conjugados específicos Emab-SN-38 y Lmab-SN-38 irrelevantes, pero Emab-SN-38 tuvo un control de crecimiento significativamente mejor en 2 de los 3 niveles probados, y con una fuerte tendencia a favor del conjugado específico. a la dosis intermedia (**FIG. 13A-13C**). De nuevo, 0,25 mg de Emab-SN-38 extirparon la mayoría de los tumores; en este documento, 7 de 10 animales estaban libres 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, con 3 de 11 animales libres de tumores al final del estudio, lo que no fue significativamente diferente de la mediana de supervivencia de 3,45 semanas para el conjugado Lmab-SN-38 irrelevante ($P = 0,452$; **FIG. 13C**).

[0319] En el modelo de leucemia diseminada 697, la mediana de supervivencia de los animales tratados con solución salina fue de solo 17 días desde la inoculación del tumor. Los animales que recibieron epratuzumab no conjugado más 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-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 largo que los animales no tratados ($P < 0,0001$) o para epratuzumab no conjugado administrado con irinotecan ($P = 0,016$). Sin embargo, Emab-

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.

[0320] Emab-SN-38 combinado con Vmab anti-CD20 no conjugado. Anteriormente informamos mejores respuestas

5 cuando ^{90}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 lo tanto, esta posibilidad se examinó con Emab-SN-38. En un estudio piloto, a 5 animales portadores de veltuzumab (0,1 mg), se les administró 0,1 mg de Emab-SN-38 o Emab-SN-38 + Vmab a tumores de Ramos subcutáneos con un promedio aproximado de $0,3 \text{ cm}^3$ (todos los agentes administrados dos veces por semana durante 4 semanas). La mediana de TTP a $2,0 \text{ cm}^3$ fue de 22, 14 y más de 77 días, respectivamente (veltuzumab frente a Emab-SN-38 solo, $P = 0,59$; Emab-SN-38 + Vmab frente a Emab-SN-38, $P = 0,0145$), proporcionando una indicación inicial de que la combinación de veltuzumab con Emab-SN-38 mejoró la respuesta terapéutica global. En un estudio de seguimiento que también usó un régimen de tratamiento de 4 semanas dos veces por semana, 6 de 11 animales que recibieron 0,1 mg de Emab-SN-38 más 0,1 mg de veltuzumab no tuvieron evidencia de tumores 16 semanas después del inicio del tratamiento, mientras que la mediana de supervivencia para los animales que recibieron veltuzumab solo o con 0,1 mg del Lmab-SN-38 de control fue de 1,9 y 3,3 semanas, respectivamente, con 3 de 11 animales sin tumor a las 16 semanas en cada uno de estos grupos (no se muestra). A pesar de la mediana de TTP más larga y más sobrevivientes, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Por lo tanto, en el modelo de Ramos, que tiene abundante CD20 y niveles moderados de CD22, el conjugado Emab-SN-38 administrado a niveles de dosis no tóxicos no fue significativamente mejor que la terapia anti-CD20 no conjugada, pero la adición de Emab-SN-38 a La terapia anti-CD20 no conjugada pareció mejorar la respuesta sin toxicidad. Es importante recalcar que los conjugados SN-38 se administran a niveles muy inferiores a su dosis máxima tolerada, por lo que estos resultados no deben interpretarse como que la terapia anti-CD20 no conjugada es igual a la del conjugado Emab-SN-38.

25 **[0321]** Se realizaron dos estudios adicionales en un modelo implantado por vía intravenosa utilizando la línea celular de NHL folicular WSU-FSCCL que tiene una baja expresión de CD20 y CD22 (no se muestra). El tiempo medio de supervivencia para los animales tratados con solución salina fue de 40 a 42 días desde la implantación del tumor. El irinotecán solo (no se muestra), administrado en una dosis que contenía 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

30 animales *sucumbieron* a progresión de la enfermedad el día 49, el mismo día que se eliminaron los últimos 4 de 15 animales en el grupo de solución salina (no mostrado). A pesar de su expresión de CD20 relativamente baja, veltuzumab solo (35 μg dos veces por semana x 4 semanas) fue efectivo en este modelo. La mediana de supervivencia aumentó a 91 días en el primer estudio, con 2 curaciones (día 161), y a 77 días en el segundo, pero sin supervivientes después de 89 días (veltuzumab solo frente a tratamiento con solución salina, $P < 0,001$ en ambos estudios). El epratuzumab no conjugado (0,3 mg/dosis) combinado con irinotecán y veltuzumab tuvo la misma mediana de supervivencia que el veltuzumab solo, lo que sugiere que ni el epratuzumab ni el irinotecán contribuyeron a la respuesta neta.

35 **[0322]** Como era de esperar debido a la baja expresión de CD22 por WSU-FSCCL, Emab-SN-38 solo no fue tan efectivo como en Ramos. Con la dosis de 0,15 mg, no se observaron beneficios significativos sobre el grupo de solución salina, pero con 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, que utilizó 0,3 mg de Emab-SN-38, confirmó una mayor supervivencia en comparación con el grupo de solución salina (75 frente a 40 días; $P < 0,0001$). La especificidad de esta respuesta no fue evidente en el primer estudio, donde la mediana de supervivencia del conjugado irrelevante Lmab-SN-38 y Emab-SN-38 no fue diferente a niveles de dosis de 0,15 o 0,3 mg (42 vs. 49 días y 63 frente a 63 días para los conjugados Emab-SN-38 frente a anti-CEACAM5-SN-38 en los 2 niveles de dosis, respectivamente). Sin embargo, en el segundo estudio, la dosis de 0,3 mg de Emab-SN-38 proporcionó una supervivencia significativamente mejor que el conjugado irrelevante (75 frente a 49 días; $P < 0,0001$). Una vez más, la dificultad para mostrar especificidad en este modelo probablemente esté relacionada con la baja expresión de CD22.

40 **[0323]** La combinación del Emab-SN-38 específico con veltuzumab aumenta sustancialmente la supervivencia, con evidencia de respuestas más sólidas que el control Lmab-SN-38. Por ejemplo, en el primer estudio, los animales tratados con veltuzumab más 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 más 0,15 mg del conjugado específico Emab-SN-38 aumentó la mediana de supervivencia a 140 días. Si bien esta mejora no fue significativamente mayor que la de veltuzumab solo ($P = 0,257$), cuando la dosis de Emab-SN-38 se aumentó a 0,3 mg con veltuzumab, 6 de 10 animales permanecieron vivos al final del estudio, lo que proporcionó una ventaja de supervivencia significativa sobre el conjugado de control más 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 del conjugado de control con veltuzumab fue nuevamente de 91 días, lo que ahora produjo una ventaja de supervivencia significativa sobre veltuzumab solo. ($P < 0,0001$). La combinación del conjugado específico Emab-SN-38 con veltuzumab extendió la mediana de supervivencia a 126 días, que fue significativamente más larga que la mediana de supervivencia de 75 y 77 días para Emab-SN-38 y veltuzumab solo,

respectivamente ($P < 0,0001$ para cada uno). Sin embargo, en este estudio, no cumplió del todo los requisitos para una mejora estadística sobre la combinación con el conjugado anti-CEACAM5-SN-38 de control ($P = 0,078$).

Discusión

- 5 **[0324]** En los últimos 10 años, los ADC han logrado avances sustanciales en la terapia del cáncer, pero también ha habido algunos contratiempos. Las ganancias ocurrieron en gran medida cuando los investigadores eligieron examinar agentes que eran demasiado tóxicos para usarse solos, pero cuando se combinaron con un anticuerpo, estos llamados ultratóxicos produjeron respuestas sustancialmente mejoradas en las pruebas preclínicas. La reciente aprobación de 10 brentuximab vedotina, un conjugado de auristatina, en el linfoma de Hodgkin y el éxito clínico con el conjugado de trastuzumab-DM1 anti-HER2-maitansina como agente único en el cáncer de mama refractario al trastuzumab no conjugado sugieren que estos ADC que contienen agentes ultratóxicos se están convirtiendo en un tratamiento aceptado modalidades. Sin embargo, los conjugados preparados con agentes que son potentes en el rango picomolar 15 pueden tener un mayor riesgo de toxicidad, ya que la reciente decisión de retirar gemtuzumab ozogamicina, el conjugado anti-CD33-calicheamicina, del mercado sugiere (Ravandi, 2011, *J Clin Oncol* 29:349-51). Por lo tanto, el éxito de un ADC puede depender de la identificación de las químicas apropiadas para unir el fármaco y el anticuerpo, así como de la definición de un objetivo adecuado que se exprese lo suficiente para permitir una administración adecuada y selectiva del agente citotóxico.
- 20 **[0325]** Desarrollamos un enlazador para acoplar SN-38 a IgG que permite que SN-38 se libere lentamente del conjugado en suero (alrededor del 50 % por día). Con este enlazador, un anticuerpo que se interioriza lentamente podría ser una terapéutica eficaz, quizás porque el conjugado localizado en un tumor libera localmente una cantidad suficiente de fármaco, incluso sin interiorizarse. El conector CL2A también se usó 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 no 25 internalizantes.
- 30 **[0326]** En este informe, ampliamos nuestra evaluación del enlazador CL2A al comparar conjugados SN-38 preparados con epratuzumab, una IgG anti-CD22 de internalización rápida, y veltuzumab, una IgG anti-CD20 de internalización lenta, para el tratamiento de tumores malignos de células B, y ahora hemos encontrado combinaciones con agentes que rompen el ADN, como inhibidores de microtúbulos e inhibidores de PARP que muestran efectos antitumorales sinérgicos. Estudios previos con el progenitor murino de epratuzumab habían indicado que la mayor parte del anticuerpo se internaliza en 1 hora y el 50 % de CD22 se vuelve a expresar 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 la menor expresión superficial de CD22. Debido a que muchas de las neoplasias malignas de células B expresan mucho más CD20 que CD22, un conjugado dirigido a CD20 podría administrar más moles de fármaco al liberar su carga tóxica después de localizarse en el tumor.
- 35 **[0327]** Estudios de citotoxicidad *in vitro* no pudieron discriminar la potencia de los conjugados específicos o incluso de un conjugado irrelevante debido a la liberación de SN-38 del conjugado al medio. De hecho, el SN-38 solo fue un poco más potente que los conjugados, lo que puede reflejar su capacidad acelerada para ingresar a la célula y activar la topoisomerasa I. Porque 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 las pruebas *in vitro* no podrían discriminar la potencia de estos 2 conjugados y, por lo tanto, recurrimos a estudios *in vivo*.
- 40 **[0328]** En modelos de xenoinjerto, ambos conjugados tenían una actividad antitumoral similar contra los tumores de Ramos, que la citometría de flujo había indicado que expresaba casi 15 veces más CD20 que CD22. Esto apoyó la selección del conjugado Emab anti-CD22-SN-38 especialmente porque podría combinarse con la terapia Vmab anti-CD20 sin conjugar sin preocuparse de que cualquiera de los agentes interfiriera con la unión del otro agente. De hecho, 45 si se usara un conjugado anti-CD20-SN-38, la dosis total de proteína IgG dada probablemente estaría por debajo del nivel típicamente necesario para tratamientos efectivos con anticuerpos anti-CD20 no conjugados, ya que la toxicidad limitante de la dosis estaría impulsada por el contenido SN-38. Agregar más antiCD20 sin marcar a un conjugado anti-CD20-SN-38 podría reducir la captación del conjugado y potencialmente disminuir su eficacia. Sin embargo, como 50 mostramos anteriormente en estudios combinados que utilizaron epratuzumab radiomarcado con veltuzumab no conjugado, se puede obtener un beneficio de ambos agentes administrados en sus dosis máximas efectivas y seguras. Los estudios *in vitro* mostraron que veltuzumab, incluso en ausencia del entrecruzamiento que se usa para mejorar la señalización, aceleró los eventos apoptóticos iniciados con Emab-SN-38. Por lo tanto, siempre que el conjugado Emab-SN-38 fuera tan efectivo como el conjugado anti-CD20, seleccionar el conjugado Emab-SN-38 es una opción lógica porque permite una terapia de combinación más efectiva, incluso en tumores donde uno o ambos抗ígenos tienen baja expresión.
- 55 **[0329]** Debido a que la mayoría de los ADC que usan fármacos ultratóxicos están unidos de manera estable, también probamos un conjugado anti-CD22-SN-38 estable en suero, pero escindible intracelularmente, pero determinamos que era de 40 a 55 veces menos potente que el enlazador CL2A. Otros han examinado una variedad de fármacos ultratóxicos conjugados con anticuerpos anti-CD20 o anti-CD22, encontrando que los conjugados de internalización

son generalmente más activos, pero también observaron que incluso los anticuerpos de internalización lenta podrían ser efectivos si el fármaco liberado penetrara la membrana celular. Si bien el enlazador de tipo CL2A puede ser apropiado para SN-38, puede no ser óptimo para un agente más tóxico, en el que incluso una liberación pequeña y sostenida en el suero aumentaría la toxicidad y comprometería la ventana terapéutica.

5 [0330] Emab-SN-38 fue activo a una dosis acumulada de 0,6 mg en ratones portadores de Ramos (75 mg dos veces por semana durante 4 semanas), lo que se extrae a una dosis humana de solo 2,5 mg/kg. Por lo tanto, Emab-SN-38 debería tener una amplia ventana terapéutica en los pacientes. Además, se combinó una dosis eficaz y segura del conjugado anti-Trop-2-SN-38 con una dosis máxima tolerada de un anticuerpo marcado con ⁹⁰Y sin un aumento 10 apreciable de la toxicidad pero con una eficacia mejorada (Sharkey et al., 2011)., Mol Cancer Ther 10:1072-81). Por lo tanto, el perfil de seguridad y eficacia de estos conjugados de anticuerpos SN-38 es muy favorable para otras terapias combinadas.

15 [0331] Aunque el irinotecán no se usa de forma rutinaria para el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, SN-38 fue tan potente en líneas celulares de linfoma y leucemia como en tumores sólidos (Cardillo et al., 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69). En la línea celular WSUFSCL, los conjugados de IgG específicos e irrelevantes fueron 20 significativamente mejores que el irinotecán, mientras que en Ramos, la mediana de TTP con el conjugado irrelevante fue más larga pero no significativamente mejor que el irinotecán. Estos resultados son consistentes con otros estudios que han demostrado que una IgG no específica es un excelente portador de fármacos y más potente *in vivo* que el fármaco libre o los conjugados preparados con albúmina o polietilenglicol (PEG)-Fc. Si bien el conjugado de PEG-SN-38 tuvo efectos antitumorales significativos, se administró en sus cantidades máximas toleradas, que oscilaron entre 10 y 30 mg/kg de equivalentes de SN-38 (Sapra et al., 2009, Haematologica 94:1456-9). Por el contrario, la dosis 25 acumulada máxima de SN-38 **63** administrado durante 4 semanas a animales portadores de Ramos fue de solo 1,6 mg/kg (es decir, la dosificación de 0,25 mg de Emab-SN-38 administrada dos veces por semana durante 4 semanas) y esto no era tóxico.

30 [0332] La actividad terapéutica específica de Emab-SN-38 pareció mejorar en las líneas celulares con mayor expresión de CD22. Por ejemplo, en Ramos, se registraron efectos terapéuticos específicos de Emab-SN-38 solo en 2 de los 3 niveles de dosis diferentes examinados, y se extirpó por completo una cantidad considerable de tumores. Por el contrario, en WSU-FSCCL que tenía una expresión de CD22 unas 2,5 veces menor, Emab-SN-38 mejoró 35 significativamente la supervivencia en comparación con el conjugado antiCEACAM5-SN-38 irrelevante en 1 de 2 estudios. Sin embargo, es importante enfatizar que cuando se usa en combinación con la terapia anti-CD20 no conjugada, Emab-SN-38 amplifica la respuesta terapéutica. Por lo tanto, la combinación de estos dos tratamientos podría aumentar la respuesta incluso en situaciones en las que CD22 no se expresa en gran medida.

40 [0333] En conclusión, usando el ligador CL2A-SN-28 menos estable, el conjugado anti-CD22-SN-38 de Emab fue igualmente activo en dosis no tóxicas *in vivo* como un conjugado similar anti-CD20-SN-38, a pesar del hecho de que la expresión de CD20 fue más de un múltiplo log mayor que CD22. Las respuestas terapéuticas se beneficiaron de la combinación de Emab-SN-38 con la terapia anti-CD20 de Vmab no conjugado, incluso cuando la expresión de CD22 45 era baja, lo que sugiere que la terapia de combinación podría mejorar las respuestas en varias neoplasias malignas de células B cuando ambos抗ígenos están presentes. Los estudios sugieren que esta combinación es muy potente en diversos modelos preclínicos de linfoma y leucemia, pero parece tener menos toxicidad para el huésped. Además, las combinaciones de este ADC con microtúbulos e inhibidores de PARP pueden ser sinérgicas para inhibir el crecimiento tumoral y prolongar la supervivencia del huésped portador del tumor. Este resultado es sorprendente, ya que se informó anteriormente que el inhibidor de PARP iniparib no logró sensibilizar a las células cancerosas. a la terapia combinada con agentes anticancerígenos estándar, como cisplatino, gemcitabina o paclitaxel (Bao et al., 2015, Oncotarget [Epub antes de la impresión, 22 de septiembre de 2015])

Ejemplo 16. Conjugados Anti-CD74 (Milatuzumab) SN-38 para el tratamiento de cánceres humanos CD74+

50 Resumen

55 [0334] CD74 es un objetivo atractivo para los conjugados de anticuerpo y 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 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 de citotoxicidad *in vitro* y terapéuticos *in vivo* 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 Raji Burkitt. 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抗ígenos diana.

60 [0335] Milatuzumab-doxorrubicina fue más efectivo 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 una expresión de superficie mucho más baja

de CD74 que Trop-2 o CEACAM6, milatuzumab-CL2A-SN-38 tuvo una eficacia similar en Capan-1 como anti-Trop-2 CL2A-SN-38, pero en NCI-N87, el anti-CEACAM6 y los conjugados anti-Trop-2 fueron superiores. Los estudios en 2 líneas celulares de hepatoma a un nivel de dosis única mostraron un beneficio significativo sobre los animales tratados con solución salina, pero no contra un conjugado de IgG irrelevante. CD74 es un objetivo adecuado para los ADC en 5 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

10 [0336] CD74, denominada cadena invariable o li, es una glicoproteína transmembrana de tipo II que se asocia con HLA-DR e inhibe la unión de péptidos antigenicos a la estructura de presentación de antígenos de clase II. Sirve como molécula chaperona, dirigiendo los complejos de cadena invariante a endosomas y lisosomas, molécula accesoria en la maduración de células B, utilizando una vía mediada por NF- κ 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 15 inhibidor de la migración de macrófagos (Leng et al., 2003, J Exp Med 197:1467-76), que está implicado en activando la proliferación celular y las vías de supervivencia.

20 [0337] 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 y col., 2004, Clin Cancer Res 10:6606-11; Stein y col., 2004, Blood 104:3705-11). Los primeros estudios tenían datos contradictorios sobre la presencia de CD74 en la membrana, en parte porque los anticuerpos contra la cadena invariable eran específicos para la porción citoplasmica de la molécula, pero también porque hay relativamente pocas copias en la superficie y su vida media en la superficie celular es muy corto. 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). Usando el anticuerpo murino anti-CD74, LL1, se estimó que la 25 línea celular de linfoma Raji Burkitt tenía 4.8×10^4 copias/célula, pero debido al rápido tránsito intracelular, se internalizaron y catabolizaron $\sim 8 \times 10^6$ moléculas de anticuerpo por día (Hansen et al., 1996, Biochem J320:293-300). Por lo tanto, la internalización de CD74 es muy dinámica, con el anticuerpo siendo movido rápidamente desde la 30 superficie y descargado dentro de la célula, seguido por 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 la unión bivalente. Estudios posteriores con una versión injertada de CDR de LL1 murino, milatuzumab (hLL1), encontraron que el anticuerpo 35 podría alterar la proliferación de células B, la migración 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 vehículo eficaz para la administración intracelular de la terapéutica del cáncer (p. ej., Griffiths et al., 2003, Clin Cancer Res 9:6567-71). Con base en los resultados preclínicos de eficacia y toxicología, los ensayos clínicos de 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, han sido iniciados.

40 [0338] Curiosamente, CD74 también se expresa en cánceres no hematopoyéticos, como gástrico, renal, de vejiga urinaria, cánceres de pulmón de células no pequeñas, ciertos sarcomas y glioblastoma (p. ej., Gold et al., 2010, Int J Clin Exp Pathol 4: 1-12), por lo que puede ser una diana terapéutica para tumores sólidos que expresen este antígeno. Dado que un conjugado de milatuzumab-doxorrubicina fue muy activo en modelos de cánceres hematológicos, era 45 una elección lógica para esta evaluación. Sin embargo, recientemente desarrollamos procedimientos para acoplar el inhibidor de topoisomerasa I altamente potente, SN-38, a anticuerpos. SN-38 es la forma activa del irinotecán, cuya farmacología y metabolismo son bien conocidos. Estos conjugados tienen una potencia nanomolar en líneas de células tumorales sólidas y se encontró que eran activos con anticuerpos que no estaban internalizados activamente. Estudios anteriores indicaron una preferencia por un enlazador (CL2A) que permitía que SN-38 se disociara del conjugado en el suero con una vida media de ~ 1 día, en lugar de otros enlazadores que eran más o menos estables en el suero. Sin embargo, dada la excepcional capacidad de internalización de milatuzumab, se desarrolló un nuevo enlazador que es 50 altamente estable en el suero, pero que puede liberar SN-38 cuando se introduce en el lisosoma.

55 [0339] La investigación actual examina las perspectivas de uso de estos tres conjugados anti-CD74 de milatuzumab, uno con doxorrubicina y dos conjugados de SN-38, para una terapia eficaz principalmente contra tumores sólidos.

Materiales y métodos

60 [0340] Líneas de células tumorales humanas. Las líneas celulares de linfoma Raji Burkitt, A-375 (melanoma), Capan-1 (adenocarcinoma pancreático), NCI-N87 (carcinoma gástrico), hepatoma Hep-G2 y mieloma MC/CAR se adquirieron de American Tissue Culture Collection (Manassas, VA). La línea celular de hepatoma HuH-7 se adquirió del Banco de Recursos de Investigación de Ciencias de la Salud de Japón (Osaka, Japón). Todas las líneas celulares se cultivaron en una incubadora con CO₂ humidificado (5 %) a 37 °C en los medios recomendados que contenían entre un 10 % y un 20 % de suero de ternera fetal y suplementos. Las células se pasaron <50 veces y se revisaron periódicamente para detectar micoplasma.

- 5 **[0341] Anticuerpos y métodos de conjugación.** Milatuzumab (anti-CD74 MAb), epratuzumab (anti-CD22), veltuzumab (anti-CD20), labetuzumab (anti-CEACAM5), hMN15 (anti-CEACAM6) y hRS7 (anti-Trop-2) son monoclonales IgG 1 humanizados. anticuerpos Los conectores CL2A y CL2E y sus derivados SN-38 se prepararon y conjugaron con anticuerpos como se describe en los Ejemplos anteriores. Los conjugados de milatuzumab-doxorrubicina se prepararon como se describió previamente (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 relación de sustitución molar de fármaco:IgG era de 5-7 (1,0 mg de la proteína contiene ~16 µg de SN-38 o 25 µg de doxorrubicina equivalente).
- 10 **[0342] Unión celular y citotoxicidad *in vitro*.** Los ensayos para comparar la unión celular de milatuzumab no conjugado y conjugado con células positivas para antígeno y las pruebas de citotoxicidad utilizaron el método de reducción de colorante MTS (Promega, Madison, WI).
- 15 **[0343] Citometría de flujo e inmunohistología.** La citometría de flujo se realizó de una manera que proporcionó una evaluación del antígeno unido a membrana o de membrana y citoplasmático solamente. La inmunohistología se realizó en secciones fijadas en formalina e incluidas en parafina de xenoinjertos de tumores subcutáneos, tinción sin métodos de recuperación de antígenos, utilizando anticuerpos a 10 µg/mL que se revelaron con un conjugado de IgG antihumana.
- 20 **[0344] Estudios *in vivo*.** Se compraron ratones desnudos hembra (4-8 semanas de edad) o ratones SCID hembra (7 semanas de edad) de Taconic (Germantown, NY) y se usaron 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. Las dosis específicas se dan en los Resultados. La toxicidad se evaluó mediante mediciones de peso semanales. Para el modelo de linfoma de Raji Burkitt, se inyectaron por vía intravenosa ratones SCID con $2,5 \times 10^6$ células Raji en 0,1 ml de medio. Cinco días después, los animales recibieron una única inyección intravenosa (0,1 ml) del conjugado o solución salina (N = 10/grupo). Los ratones se observaron diariamente en busca de signos de angustia y parálisis, y se les practicó la eutanasia cuando se desarrolló parálisis en las patas traseras, >15 % de pérdida del peso inicial o si estaban moribundos (criterios de valoración sustitutos de la supervivencia).
- 25 **[0345]** Los tumores subcutáneos se midieron con un calibrador en dos dimensiones, y el volumen del tumor (TV) 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, y los animales se sacrificaron cuando los tumores crecieron hasta 1,0 cm³ (es decir, punto final de supervivencia sustituto). La línea celular de melanoma A-375 (6×10^6 células en 0,2 ml) se implantó en ratones desnudos y la terapia se inició cuando los tumores promediaron $0,23 \pm 0,06$ cm³ (N = 8/grupo). Capan-1 se implantó por vía subcutánea en ratones desnudos usando una combinación de suspensión tumoral de tumores sometidos a pases en serie (0,3 ml de una suspensión tumoral al 15 % p/v) combinados con 8×10^6 células de cultivo tisular. Los tratamientos se iniciaron cuando TV promedió $0,27 \pm 0,05$ cm³ (N = 10/grupo). Los xenoinjertos de tumor gástrico NCI-N87 se iniciaron inyectando subcutáneamente 0,2 ml de una mezcla 1:1 (v/v) de matrigel y 1×10^7 células del cultivo terminal. La terapia se inició cuando la TV promedió $0,249 \pm 0,045$ cm³ (N = 7/grupo). Se siguió el mismo procedimiento para desarrollar los xenoinjertos de hepatoma Hep-G2 y HuH-7 en ratones desnudos. La terapia se inició cuando Hep-G2 promedió $0,364 \pm 0,062$ cm³ (N = 5/grupo) y HuH-7 promedió $0,298 \pm 0,055$ cm³ (N = 5/grupo).
- 30 **[0346]** La eficacia se expresa en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, utilizando los puntos finales sustitutos mencionados anteriormente para determinar los tiempos medios de supervivencia. El análisis se realizó mediante una prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox) utilizando el software Prism GraphPad (LaJolla, CA), con una significancia de $P < 0,05$.
- 35 **Resultados**
- 40 **[0347] Expresión de CD74 en líneas de células tumorales humanas y xenoinjertos.** Seis líneas celulares derivadas de 4 tipos de tumores sólidos diferentes se identificaron como positivas para CD74 basándose principalmente en el análisis de células permeabilizadas (**Tabla 15**), ya que la MFI de CD74 solo de membrana en las líneas celulares de tumores sólidos muy a menudo era <2 veces mayor que el MFI de fondo (excepto la línea celular de melanoma A-375). La expresión de CD74 superficial en Raji fue >5 veces mayor que en las líneas celulares de tumor sólido, pero el CD74 total en las células Raji permeabilizadas fue similar a la mayoría de las líneas celulares de tumor sólido.

Tabla 15. Expresión de CD74 por citometría de flujo expresada como intensidad fluorescente media (MFI) de células seleccionadas positivas para milatuzumab.					
Línea celular	Superficie		Superficie y citoplasma		Relación MFI hLL1: bkgd
	hLL1 (bkgd) ^a	Relación MFI hLL1: bkgd	hLL1 (bkgd) ^b		
Panel CA ^c	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
ND, no se realizó					

^aMFI de fondo de células incubadas solo con GAH-FITC.

[0348] La inmunohistología mostró que los xenoinjertos subcutáneos de Raji tenían una tinción intensa y en gran parte uniforme, con un marcaje prominente en la superficie celular (no mostrado). La línea celular de hepatoma Hep-G2 tuvo la captación más uniforme de los tumores sólidos, con tinción moderadamente fuerte, pero predominantemente citoplásica (no se muestra), seguida por la línea celular de melanoma A-375 que tuvo una tinción algo menos uniforme con tinción más intensa, aunque principalmente expresión citoplasmática (no mostrada). Las líneas celulares de carcinoma gástrico de páncreas Capan-1 (no mostrada) y NCI-N87 (no mostrada) tenían una tinción CD74 de moderada (Capan-1) a intensa (NCIN87), pero no estaba uniformemente distribuida. La línea celular de hepatoma HuH-7 (no mostrada) tenía la tinción menos uniforme y más débil.

[0349] Inmunorreactividad de los conjugados. Los valores de K_d para los conjugados de milatuzumab no conjugado, milatuzumab-CL2A- y CL2ESN-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 doxorrubícina 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).

[0350] Liberación de fármacos *in vitro* y estabilidades séricas de los conjugados. Los mecanismos de liberación de SN-38 de los enlazadores CL2A y CL2E rematados con mercaptoetanol se determinaron en un entorno que simulaba parcialmente las condiciones lisosomales, a saber, pH bajo (pH 5,0), y en presencia o ausencia de catepsina B. El CL2E-SN-38 era inerte a pH 5 en ausencia de la enzima (no se muestra), pero en presencia de catepsina B, la escisión en el sitio Phe-Lys avanzó rápidamente, con una vida media de 34 min (no se muestra). La formación de SN-38 activo requiere la ciclación intramolecular del enlace carbamato en la décima posición de SN-38, que ocurrió más lentamente, con una vida media de 10,7 h (no se muestra).

[0351] Como se esperaba, 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, liberando SN-38 activo a una velocidad similar a la del enlazador CL2E a pH 5,0, con una vida media de ~ 10,2 h (no mostrado). El conjugado de milatuzumab-doxorrubícina, que tiene un enlace de acilhidrazona sensible al pH, tuvo una vida media de 7 a 8 h a pH 5,0 (no se muestra).

[0352] Si bien todos estos enlazadores liberan el fármaco a velocidades relativamente similares en condiciones relevantes para los lisosomas, tienen estabilidades muy diferentes en el suero. Milatuzumab-CL2A-SN-38 liberó el 50 % de SN-38 libre en $21,55 \pm 0,17$ h (no se muestra), en consonancia con otros conjugados de CL2A-SN-38. Sin embargo, el conjugado CL2E-SN-38 era muy inerte, con una vida media extrapolada a -2100 h. El conjugado de milatuzumab-doxorrubícina liberó el 50 % de la doxorrubícina en 98 h, lo que fue similar a otros 2 conjugados de anticuerpo-doxorrubícina (no mostrados).

[0353] Citotoxicidad. Una cuestión importante relacionada con la evaluación de estos conjugados fue la potencia relativa de la doxorrubícina libre y el SN-38 en las líneas de células tumorales sólidas y hematopoyéticas. Nuestro grupo informó previamente que SN-38 era activo en varias líneas celulares de linfoma de células B y leucemia aguda, con potencias que oscilaban entre 0,13 y 2,28 nM (Sharkey et al., 2011, Mol Cancer Ther 11: 224-34). La potencia de SN-38 en 4 de las líneas de células tumorales sólidas que se usaron posteriormente para estudios de terapia *in vivo* osciló entre 2,0 y 6 nM (no se muestra). La doxorrubícina tuvo una respuesta mixta, con una potencia de 3-4 nM en las líneas celulares de linfoma Raji y melanoma A-375, pero fue casi 10 veces menos potente contra las líneas celulares Capan-1, NCI-N87 y Hep G2. Otros estudios que compararon la potencia de SN-38 con la doxorrubícina encontraron: cáncer de colon LS174T, 18 frente a 18 (potencia nM de SN-38 frente a doxorrubícina, 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 de páncreas Capan-2, 37 frente a 221 nM; y cáncer de pulmón de células pequeñas NCI-H466, 0,1 frente a 2 nM. Por lo tanto, SN-38 fue de 5 a 20 veces más potente que la doxorrubícina en

4 de estas 6 líneas celulares, con una potencia similar en LS174T y MDA-MB-231. En conjunto, estos datos indican que la doxorrubicina es menos eficaz contra los tumores sólidos que el SN-38, mientras que el SN-38 parece ser igualmente eficaz en los tumores sólidos y hematopoyéticos.

5 **[0354]** Como era de esperar, las 3 formas conjugadas fueron a menudo un orden de magnitud menos potentes que el fármaco libre *in vitro*, ya que se espera que ambos fármacos se transporten fácilmente a las células, mientras que los conjugados de fármacos requieren la unión de anticuerpos para transportar el fármaco dentro de la célula (no se muestra). El conjugado de SN-38 ligado a CL2A es una excepción, ya que más del 90 % del SN-38 se libera del conjugado al medio durante el período de ensayo de 4 días (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 internalizara rápidamente, sería difícil discernir las diferencias entre el fármaco libre y el fármaco unido a CL2A.

10 **[0355]** El SN-38 estable vinculado a CL2E se desempeñó comparativamente bien en la línea celular Raji, en comparación con el SN-38 libre, pero tuvo una potencia sustancialmente menor (7 a 16 veces) en las 4 líneas celulares de tumor sólido, lo que sugiere la relativamente baja la expresión superficial de CD74 puede desempeñar un papel en la minimización del transporte de fármacos en estos tumores sólidos. El conjugado de milatuzumab-doxorrubicina tuvo diferencias sustanciales en su potencia en comparación con la doxorrubicina libre en todas las líneas celulares, que fue de una magnitud similar a la de los conjugados CL2E-SN-38 con SN-38 libre en las líneas celulares de tumor sólido.

15 **[0356]** En las 6 líneas celulares adicionales mencionadas anteriormente, el conjugado de milatuzumab-CL2A-SN-38 fue de 9 a 60 veces más potente que el conjugado de milatuzumab-doxorrubicina (no se muestra), pero nuevamente, este resultado estuvo influenciado en gran medida por el hecho de que el conjugado ligado a CL2A libera la mayor parte de su SN-38 en el medio durante el período de incubación de 4 días, mientras que el conjugado de doxorrubicina 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.

20 **[0357]** Terapia *in vivo* de xenoinjertos de tumores humanos. Estudios previos *in vivo* con milatuzumab-doxorrubicina o conjugados 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 lo tanto, las pruebas *in vivo* se centraron en comparar cantidades similares, pero fijas, de cada conjugado a niveles bien tolerados.

25 **[0358]** Los estudios iniciales primero examinaron los conjugados de doxorrubicina y SN-38 en un modelo de linfoma Raji diseminado para evaluar cómo se compara 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 no dirigido o los animales tratados con solución salina, que tuvieron una mediana de supervivencia de solo 20 días ($P < 0,0001$). A pesar de que los estudios *in vitro* indicaron una ventaja de hasta 8 veces para los conjugados de SN-38 en Raji, la mejor supervivencia se observó con los conjugados de milatuzumab-doxorrubicina, donde todos los animales recibieron una dosis única de 17,5 mg/kg (350 mg) y 7/10 animales que recibieron 2,0 mg/kg (40 mg) estaban vivos al finalizar el estudio (día 112) (p. ej., 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 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 los estudios *in vitro* sugirieron que ambos conjugados libera SN-38 activo a tasas similares cuando se internaliza.

30 **[0359]** Se examinaron cinco líneas celulares de tumor sólido, comenzando con la línea celular de melanoma A-375, ya que tenía la mejor respuesta *in vitro* tanto a la doxorrubicina como a la SN-38. Los xenoinjertos A-375 crecieron rápidamente, teniendo los animales de control tratados con solución salina una supervivencia media de sólo 10,5 días (no se muestra). Una dosis dos veces por semana de 12,5 mg/kg (0,25 mg por animal) del conjugado milatuzumab-CL2A-SN-38 prolongó la supervivencia a 28 días ($P = 0,0006$), que fue significativamente mejor que el conjugado epratuzumab-CL2A-SN-38 de control que tenía una mediana de supervivencia de 17,5 días ($P = 0,0089$), siendo esta última no significativamente diferente de los animales tratados con solución salina ($P = 0,1967$). El conjugado milatuzumab-CL2A proporcionó una supervivencia significativamente mayor que el conjugado milatuzumab-CL2E-SN-38 ($P = 0,0014$), que tuvo la misma mediana de supervivencia de 14 días que su control conjugado epratuzumab-CL2E-SN-38. A pesar de administrar una dosis dos veces mayor de milatuzumab-doxorrubicina que los conjugados SN-38, la mediana de supervivencia no fue mejor que la de los animales tratados con solución salina (10,5 días).

35 **[0360]** Al igual que con el modelo de melanoma A-375, en Capan-1, solo el conjugado SN-38 ligado a CL2A fue efectivo, con una mediana de supervivencia de 35 días, significativamente diferente de los animales no tratados ($P < 0,036$) (no mostrado), incluso a una dosis más baja (5 mg/kg; 100 mg por animal) ($P < 0,02$). Ni el milatuzumab-CL2E ni los conjugados de epratuzumab-CL2A-SN-38 no dirigidos, o una dosis dos veces mayor del conjugado de milatuzumab-doxorrubicina, proporcionaron ninguna ventaja de supervivencia ($p = 0,44$ frente a solución salina). Es

de destacar que en el mismo estudio con animales que recibieron la misma dosis del conjugado internalizante anti-Trop-2 CL2A-SN-38 (hRS7-SN-38; IMMU-132), la mediana de supervivencia fue igual a milatuzumab-CL2A-SN-38 (no se muestra). El conjugado hRS7-CL2A-SN-38 se había identificado previamente como un ADC de interés para tratar una variedad de tumores sólidos (Cardillo et al., 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69). El MFI para hRS7 de unión a superficie en Capan-1 fue de 237 (no se muestra), en comparación con 22 para milatuzumab (consulte la **Tabla 15**). Por lo tanto, a pesar de tener una expresión de antígeno de superficie sustancialmente más baja, el conjugado milatuzumab-CL2A-SN-38 funcionó tan bien como el conjugado hRS7-CL2A-SN-38 en este modelo.

[0361] Dado que el conjugado de milatuzumab-doxorrubicina tuvo 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 más 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.

[0362] En el modelo de tumor gástrico, NCI-N87, los animales que recibieron 17,5 mg/kg/dosis (350 mg) de milatuzumab-CL2A-SN-38 proporcionaron cierta mejora en la supervivencia, pero no alcanzaron la significación estadística en comparación con los tratados con solución salina. animales (31 frente a 14 días; $P = 0,0760$) o al conjugado anti-CD20-CL2A-SN39 de veltuzumab que no se une (21 días; $P = 0,3128$) (no se muestra). Sin embargo, los conjugados hRS7- y hMN-15-CL2A mejoraron significativamente la mediana de supervivencia a 66 y 63 días, respectivamente ($P = 0,0001$). El MFI para Trop-2 y CEACAM6 expresados en superficie fueron 795 y 1123, respectivamente, mucho más altos que CD74 que fue solo 5 (ver **Tabla 15**). La inmunohistología mostró una expresión citoplasmática relativamente intensa de CD74 en el xenoinjerto de esta línea celular, pero lo que es más importante, estaba dispersa, apareciendo solo en bolsas definidas dentro del tumor (no se muestra). CEACAM6 y Trop-2 se expresaron más uniformemente que CD74 (no se muestra), estando CEACAM6 más intensamente presente tanto en el citoplasma como en la membrana, y Trop-2 principalmente en la membrana. Por lo tanto, la supervivencia mejorada con los conjugados anti-CEACAM6 y anti-Trop-2 muy probablemente refleja tanto una mayor densidad de antígenos como una expresión más uniforme en NCI-N87.

[0363] En la línea celular de hepatoma Hep-G2 (no mostrada), la inmunohistología mostró una expresión muy uniforme con una tinción citoplasmática moderada de CD74, y la citometría de flujo indicó una expresión superficial relativamente baja (MFI = 9). El MFI con hMN-15 fue 175 y la inmunohistología mostró una expresión citoplasmática y de membrana bastante uniforme de CEACAM6, con bolsas aisladas de tinción de membrana muy intensa (no mostrada). Un estudio en animales con xenoinjertos de Hep-G2 encontró que el milatuzumab-CL2A-SN-38 extendió la supervivencia a 45 días en comparación con los 21 días en el grupo tratado con solución salina ($P = 0,0048$), mientras que el hMN-15-CL2A-SN-38 conjugado mejoró la supervivencia a 35 días. Hubo una tendencia a favor del conjugado de milatuzumab sobre 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 que no se une proporcionó una ventaja de supervivencia similar a la del conjugado de milatuzumab. Previamente, observamos que los resultados terapéuticos con conjugados que no se unen podrían ser similares a los del conjugado específico ligado a CL2A, particularmente a dosis más altas de proteínas, pero la titulación de los conjugados específicos y de control generalmente se revela de manera selectiva. Por lo tanto, ninguno de los conjugados específicos proporcionó una ventaja terapéutica selectiva a estas dosis en esta línea celular.

[0364] Otro estudio que usó la línea celular de hepatoma HuH-7 (no se muestra), que tenía una expresión de superficie similar, pero niveles citoplasmáticos ligeramente más bajos que Hep-G2 (consulte la Tabla 15), encontró que el conjugado hMN-15-SN-38 proporcionaba una mayor (35 frente a 18 días), aunque no significativamente diferente, ventaja de supervivencia que el conjugado milatuzumab-CL2A ($P = 0,2944$). Si bien los conjugados de hMN-15 y milatuzumab fueron significativamente mejores que 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 no dirigido a este nivel de dosis ($P = 0,4602$ y $0,9033$, respectivamente). La expresión superficial de CEACAM6 fue relativamente baja en esta línea celular (MFI = 81), y la inmunohistología mostró que tanto CD74 (no mostrado) como CEACAM6 (no mostrado) eran muy débiles y muy dispersos.

Discusión

[0365] El enfoque del conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para la quimioterapia selectiva de tumores es un área 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 éxitos clínicos recientes (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 un en gran parte con la adopción de fármacos supertóxicos en lugar de los agentes quimioterapéuticos convencionales que se habían utilizado anteriormente. Sin embargo, la selección del objetivo, el anticuerpo y el enlazador del fármaco 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 se internaliza y el propio anticuerpo tiene actividad antitumoral, todo lo cual podría combinarse para mejorar el resultado terapéutico. En marcado contraste, CD74 se expresa a un nivel mucho más bajo en la superficie de las células, pero sus propiedades únicas de internalización y reexpresión en la superficie han permitido

que un ADC anti-CD74 de milatuzumab sea eficaz en modelos de xenoinjerto de cáncer hematopoyético incluso con un fármaco moderadamente tóxico., como la doxorrubicina (Griffiths et al., 2003, Clin Cancer Res 9:6567-71; Sapra et al., 2005, Clin Cancer Res 11:5257-64). Aunque la doxorrubicina se usa con más frecuencia en los cánceres hematopoyéticos, mientras que el SN-38 y otras camptotecinas se administran a pacientes con tumores sólidos, 5 decidimos evaluar la utilidad de la doxorrubicina y los conjugados de SN-38 de milatuzumab en tumores sólidos. El conjugado de milatuzumab-doxorrubicina fue efectivo en modelos de xenoinjerto de varios cánceres hematológicos, lo que llevó a su prueba clínica (NCT01101594 y NCT01585688), mientras que varios conjugados de SN-38 fueron 10 efectivos en modelos de tumores sólidos y hematológicos, lo que llevó a la creación de 2 nuevos conjugados de SN-38. buscado en ensayos clínicos de Fase I de cáncer colorrectal y epitelial diverso (NCT01270698 y NCT01631552).

10 **[0366]** La doxorrubicina y SN-38 no conjugadas *in vitro* tuvieron una potencia similar a la de la doxorrubicina contra la línea celular de linfoma Raji, pero SN-38 fue más potente en varias líneas celulares de tumores sólidos diferentes. Curiosamente, *in vivo*, el conjugado de milatuzumabdoxorrubicina proporcionó la mejor respuesta en Raji en 15 comparación con los conjugados de milatuzumab-SN-38. Sin embargo, en Capan-1 y A-375, milatuzumab-doxorrubicina fue menos eficaz que el conjugado de milatuzumab SN-38 ligado a CL2A, aunque las pruebas *in vitro* indicaron que A-375 era igualmente sensible a la doxorrubicina libre que a la SN-38 libre. Otras dos líneas celulares, 20 cáncer de mama MDA-MB-231 y cáncer de colon LS174T, también tenían una potencia similar con doxorrubicina libre como SN-38 *in vitro*, pero dado que las pruebas *in vitro* indicaron que SN-38 era igualmente eficaz en cánceres sólidos y hematológicos, y dado que SN-38 tiene una potencia de 5 a 20 veces mayor que la doxorrubicina 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 evaluar mejor la utilidad de los conjugados de milatuzumab-SN-38, incluimos una evaluación comparativa con los ADC de SN-38 preparados con anticuerpos contra otros antígenos que están presentes en una variedad de tumores sólidos.

25 **[0367]** Anteriormente habíamos investigado las respuestas terapéuticas con el conjugado SN-38 ligado a CL2A anti-Trop-2 hRS7 internalizado en la línea celular Capan-1 (Cardillo et al., 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69), y por lo tanto el Se comparó la eficacia de los conjugados milatuzumab y hRS7 SN-38. En este estudio, ambos conjugados mejoraron significativamente la supervivencia en comparación con los anticuerpos de control, y los conjugados de SN-38 ligados a CL2A de cada uno fueron superiores a los conjugados ligados a CL2E. Dado que la citometría de flujo 30 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 eficientes que las de Trop-2. Sin embargo, es bien sabido que la accesibilidad del antígeno (es decir, barreras de membrana frente a citoplasma, fisiológicas y de "sitio de unión") y la distribución entre las células dentro de un tumor son factores críticos que influyen 35 en todas las formas de terapia dirigida, en particular aquellas que dependen de una concentración intracelular adecuada. suministro de un producto a células individuales (Thurber et al., 2008, Adv Drug Del Rev 60: 1421-34). En situaciones en las que el antígeno no se expresa uniformemente en todas las células dentro del tumor, tener un agente dirigido que libere lentamente su carga útil después de localizarse en el tumor, como los conjugados ligados a CL2A, permitiría que el fármaco se difunda a las células testigo no dirigidas. mejorando así su rango de eficacia. De hecho, 40 la alta expresión de antígeno podría impedir potencialmente 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. También se cree que este mecanismo ayuda a la eficacia de otros conjugados que hemos examinado utilizando anticuerpos de internalización deficiente, como anti-CEACAM5 y anti-CEACAM6 utilizados en este documento. Los conjugados basados en milatuzumab dependen más de la interacción directa del anticuerpo con 45 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 esté muy disperso dentro del tumor, y sin un mecanismo para retener el conjugado dentro del tumor, se perdería el beneficio de la liberación lenta del fármaco del conjugado. Una revisión previa de tumores gastrointestinales humanos realizada por nuestro grupo sugiere que a menudo tienen un alto nivel de expresión con buena uniformidad (Gold et al., 2010, Int J Clin Exp Pathol 4:1-12).

50 **Ejemplo 17. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar el cáncer de mama metastásico refractario a la terapia**

55 **[0368]** 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 la mama izquierda en 2005, seguida de ACT de dosis densa en un entorno adyuvante en septiembre de 2005. A continuación, recibió radioterapia, que finalizó en noviembre. La recurrencia local de la enfermedad se identificó cuando la paciente palpó un bulto en el seno contralateral (derecho) a principios de 2012 y luego se trató con quimioterapia CMF (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo). Su enfermedad recorrió en el mismo año, con lesiones metastásicas en la piel de la pared torácica. A continuación, recibió un régimen de quimioterapia con carboplatino + TAXOL®, durante el cual se produjo una trombocitopenia. Su enfermedad progresó y comenzó con doxorrubicina semanal, que continuó durante 60 6 dosis. La enfermedad de la piel también estaba progresando. Una exploración FDG-PET el 26/09/12 mostró progresión de la enfermedad en la pared torácica y ganglios axilares sólidos y agrandados. El paciente recibió oxicodona para el control del dolor.

[0369] Recibió IXEMPRa® desde octubre de 2012 hasta febrero de 2013 (cada 2 semanas durante 4 meses), cuando la lesión de la pared torácica se abrió y sangró. A continuación, le recetaron XELODA®, que no fue bien tolerado debido a la neuropatía en sus manos y pies, así como estreñimiento. Las lesiones cutáneas fueron progresivas y luego se inscribió en el ensayo IMMU-132 después de dar su consentimiento informado. El paciente también tenía antecedentes médicos de hipertiroidismo y trastornos visuales, con alto riesgo de enfermedad del SNC (sin embargo, la resonancia magnética cerebral fue negativa para enfermedad del SNC). En el momento de la inscripción en este ensayo, sus lesiones cutáneas (objetivo) en la mama derecha median 4,4 cm y 2,0 cm en el diámetro más grande. Tenía otra lesión no diana en la mama derecha y un ganglio linfático agrandado en la axila derecha e izquierda.

5 **[0370]** La primera infusión de IMMU-132 (12 mg/kg) se inició el 12 de marzo de 2013, la cual fue bien tolerada. Su segunda infusión se retrasó debido a una reducción del recuento absoluto de neutrófilos (RAN) de Grado 3 (0,9) en el día programado de la infusión, una semana después. Tras una semana de retraso y tras recibir NEULASTA®, se le administró su segunda IMMU-132, con una reducción del 25% de la dosis a 9 mg/kg. A partir de entonces, ha estado recibiendo IMMU-132 según lo programado según el protocolo, una vez por semana durante 2 semanas, luego 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, lo que constituye una respuesta parcial según los criterios RECIST. Continúa el tratamiento al nivel de dosis de 9 mg/kg. Su salud general y sus síntomas clínicos mejoraron considerablemente desde que comenzó el tratamiento con IMMU-132.

10 **Ejemplo 18. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico refractario**

15 **[0371]** Se trata de un hombre de 60 años diagnosticado de cáncer de pulmón de células no pequeñas. El paciente recibe regímenes de quimioterapia de carboplatino, bevacizumab durante 6 meses y muestra una respuesta, y luego, después de progresar, recibe ciclos adicionales de quimioterapia con carboplatino, etopósido, TAXOTERE®, 25 gemcitabina durante los próximos 2 años, con respuestas ocasionales que no duran más de 2 meses. El paciente presenta entonces una masa mediastínica izquierda de 6,5 x 4 cm y derrame pleural.

30 **[0372]** 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, se experimentan períodos breves de neutropenia y diarrea, con 4 deposiciones en 4 horas, pero se resuelven o responden a medicamentos sintomáticos en 2 días. Después de un total de 6 infusiones de IMMU-132, la evaluación por TC de la lesión índice muestra una reducción del 22 %, justo por debajo de una respuesta parcial pero una reducción definitiva del tumor. El paciente continúa con esta terapia durante otros dos meses, cuando se observa por TC una respuesta parcial de reducción tumoral del 45% de la suma de los 35 diámetros de la lesión índice, constituyendo así una respuesta parcial según los criterios RECIST.

35 **Ejemplo 19. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) más olaparib para tratar cáncer de pulmón de células pequeñas metastásico refractario**

40 **[0373]** Esta es una mujer de 65 años con un diagnóstico de cáncer de pulmón de células pequeñas, que afecta el pulmón izquierdo, los ganglios linfáticos mediastínicos y evidencia de metástasis en el lóbulo parietal izquierdo del cerebro en la resonancia magnética. La quimioterapia previa incluye carboplatino, etopósido y topotecán, pero no se observó respuesta. La radioterapia tampoco logra controlar su enfermedad. A continuación, recibe una terapia combinada con IMMU-132 más olaparib en un ciclo de 21 días. Olaparib se administra a 200 mg dos veces al día en 45 los días 1-10 del ciclo. IMMU-132 se administra a 8 mg/kg los días 1 y 8 del ciclo. Después de 3 ciclos, hay una reducción del 31 % de la suma de los diámetros más largos de los tumores de pulmón y ganglios linfáticos por TC, mientras que la supuesta metástasis cerebral ya no se detecta. Esto constituye un PR por RECIST 1.1, porque la reducción se confirma 4 semanas más tarde (35 % de reducción de la suma de todas las lesiones diana. Continúa su dosificación de IMMU-132 cada 3 semanas durante otros 3 meses y continúa mostrando y mejora subjetiva de su condición.

50 **Ejemplo 20. Terapia de un paciente con cáncer gástrico con enfermedad metastásica en estadio IV con hRS7-SN-38 (IMMU-132) más paclitaxel**

55 **[0374]** Este paciente es un varón de 60 años con antecedentes de tabaquismo y períodos de consumo excesivo de alcohol durante un período de 40 años. Experimenta pérdida de peso, incomodidad para comer y dolor que no se alivia con los antiácidos, dolor abdominal frecuente, dolor lumbar y, más recientemente, ganglios palpables en ambas axilas. Busca consejo médico y, después de un estudio, se muestra que tiene un adenocarcinoma, incluidas algunas características escamosas, en la unión gastroesofágica, según una biopsia a través de un gastroscopio. Los estudios radiológicos (TC y FDG-PET) también revelan enfermedad metastásica en axila derecha e izquierda, región mediastínica, columna lumbar e hígado (2 tumores en el lóbulo derecho y 1 en el izquierdo, todos de entre 2 y 4 cm de diámetro). Se reseca su tumor gástrico y luego se lo somete a un ciclo de quimioterapia con epirubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo. Después de 4 meses y un período de descanso de 6 semanas, se cambia a quimioterapia con docetaxel, que tampoco logra controlar su enfermedad, según la progresión confirmada por mediciones de TC de los tumores metastásicos y cierto deterioro general.

[0375] Luego, el paciente recibe una terapia combinada con IMMU-132 (hRS7-SN-38) y paclitaxel en un ciclo de 21 días. Paclitaxel se administra a dosis de 175 mg/m² los días 1, 7 y 14 del ciclo. IMMU-132 se administra a 10 mg/kg los días 1 y 8 del ciclo. Después de 3 ciclos, se realizan estudios de TC para evaluar el estado de su enfermedad. Las infusions son bien toleradas, con algunas náuseas y diarreas leves, y también con neutropenia Grado 3, controlada con medicamentos sintomáticos y con G-CSF (Neulasta[®]) para la neutropenia. Los estudios de TC revelan que la suma de sus lesiones metastásicas de índice ha disminuido en un 28 %, por lo que continúa con esta terapia durante otros 5 ciclos. Los estudios de TC de seguimiento muestran que la enfermedad permanece reducida en aproximadamente un 35 % según los criterios RECIST con respecto a sus mediciones iniciales antes de la terapia combinada, y su estado general también parece haber mejorado, con el paciente recuperando una actitud optimista hacia el control de su enfermedad.

Ejemplo 21. Terapia de paciente con cáncer de colon avanzado refractario a quimioinmunoterapia previa, utilizando únicamente IMMU-130 (labetuzumab-SN-38)

[0376] El paciente es 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. A continuación, recibió quimioterapia, como se indica en la FIG. 14, que incluía irinotecán, oxaliplatin, FOLFIRINOX (5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, oxaliplatin) y bevacizumab, así como bevacizumab combinado con 5-fluorouracilo/leucovorina, durante casi 2 años. A partir de entonces, recibió cursos de cetuximab, ya sea solo o combinado con quimioterapia FOLFIRI (leucovorina, 5-fluorouracilo, irinotecán) durante el año siguiente o más. En 2009, recibió terapia de ablación por radiofrecuencia de sus metástasis hepáticas mientras estaba bajo quimioinmunoterapia, y a finales 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 haber recibido quimioinmunoterapia en 2011, aparecieron nuevas metástasis pulmonares a finales de 2011, y en 2012 se visualizaron metástasis tanto pulmonares como hepáticas. Su título inicial de antígeno carcinoembrionario (CEA) en plasma fue de 12,5 ng/ml justo antes de someterse a la terapia de anticuerpos y fármacos con IMMU-130. Las lesiones índice 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, ambas con un total de 91 mm como la suma de sus diámetros más largos en la línea de base antes de la terapia de IMMU-130 (anti-CEACAM5-SN-38).

[0377] Este paciente recibió dosis de 16 mg/kg de IMMU-130 por infusión IV lenta cada dos semanas para un total de 17 dosis de tratamiento. El paciente toleró bien la terapia, teniendo solo náuseas, diarrea y fatiga de grado 1 después del primer tratamiento, lo que ocurrió 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 o 3 días, y su fatiga después de la primera infusión duró 2 semanas. Por lo demás, el paciente toleró bien la terapia. Debido a la larga duración de la recepción de este anticuerpo humanizado (injertado con CDR) conjugado con SN-38, se midió su sangre en busca de anticuerpos anti-labetuzumab y no se detectó ninguno, incluso después de 16 dosis.

[0378] 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, antes de esta terapia, en las lesiones índice. Después de 8 tratamientos, esta reducción pasó a ser del 40,6%, constituyendo así una remisión parcial según los criterios RECIST. Esta respuesta se mantuvo durante otros 2 meses, cuando sus mediciones de TC indicaron que las lesiones índice eran un 31,9 % menores que las mediciones iniciales, pero algo más altas que la disminución anterior del 40,6 % medido. Por lo tanto, con base en mediciones cuidadosas de TC de las lesiones índice en el pulmón y el hígado, este paciente, que había fracasado con la quimioterapia y la inmunoterapia previas, incluido el irinotecán (molécula principal de SN-38), mostró una respuesta objetiva al metabolito activo del irinotecán (o camptotecina), SN-38, cuando se dirige 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 antiCEACAM5 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 previamente a su última terapia que contiene irinotecán. La reducción del título de CEA en plasma del paciente también corroboró los hallazgos de la TC: cayó del nivel inicial 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. Normalmente se considera que el título plasmático normal de CEA está entre 2,5 y 5,0 ng/ml, por lo que esta terapia efectuó una normalización de su título CEA en la sangre.

Ejemplo 22. Terapia de un paciente con cáncer de colon avanzado con IMMU-130 más mesilato de eribulina

[0379] Esta paciente es una mujer de 75 años inicialmente diagnosticada con cáncer de colon metastásico (Estadio IV). Tiene una hemicolectomía parcial derecha y resección de su intestino delgado y luego recibe las terapias FOLFOX, FOLFOX + bevacizumab, FOLFIRI + ramucirumab y FOLFIRI + cetuximab durante un año y medio, cuando muestra progresión de la enfermedad, con diseminación de la enfermedad al fondo de saco posterior, omento, con ascitis en la pelvis y derrame pleural en el lado derecho de la cavidad torácica. Su título basal de CEA en plasma justo antes de esta terapia es de 15 ng/ml. Recibe terapia combinada con mesilato de eribulina (1,4 mg/m²) e IMMU-130 (anti-

CEACAM5-SN-38) 10 mg/kg, ambos administrados los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días, que se tolera muy bien, sin ninguna toxicidad hematológica o no hematológica importante. Dentro de los 2 meses de terapia, su título de CEA en plasma se reduce modestamente a 1,3 ng/ml, pero en la evaluación de 8 semanas muestra una reducción del 21 % de las lesiones tumorales índice, que aumenta a una reducción del 27 % a las 13 semanas. Sorprendentemente, la ascitis y el derrame pleural del paciente disminuyen (desapareciendo este último) en este momento, mejorando así notablemente el estado general del paciente. La paciente continúa con su terapia de investigación.

Ejemplo 23. Paciente con cáncer gástrico con enfermedad metastásica en estadio IV tratada con IMMU-130 más rucaparib

[0380] El paciente es un varón de 52 años que consultó por malestar gástrico y dolor relacionado con la alimentación desde hacia unos 6 años, y con pérdida de peso en los últimos 12 meses. La palpación del área del estómago revela un bulto firme que luego se gastroscopia, revelando una masa ulcerosa en la parte inferior del estómago. Se realiza una biopsia y se diagnostica como un adenocarcinoma gástrico. Las pruebas de laboratorio no revelan cambios anormales específicos, excepto que las pruebas de función hepática, LDH y CEA plasmático están elevados, siendo este último de 10,2 ng/ml. A continuación, la paciente se somete a una PET de cuerpo entero, que revela, además del tumor gástrico, enfermedad metastásica en la axila izquierda y en el lóbulo hepático derecho (2 metástasis pequeñas). Al paciente se le reseca el tumor gástrico y luego se le toman medidas basales de TC de sus tumores metastásicos. Cuatro semanas después de la cirugía, recibe 3 cursos de quimioterapia combinada que consisten en un régimen de cisplatino y 5-fluorouracilo (CF), pero no lo tolera bien, por lo que se cambia al tratamiento con docetaxel. Parece que la enfermedad se estabiliza durante aproximadamente 4 meses, según las tomografías computarizadas, pero luego las quejas del paciente de mayor pérdida de peso, dolor abdominal, pérdida de apetito y fatiga extrema hacen que se repitan los estudios de tomografía computarizada, que muestran un aumento en el tamaño de las metástasis, por una suma del 20% y una lesión sospechosa en el sitio de la resección gástrica original.

[0381] A continuación, el paciente recibe una terapia combinada con IMMU-130 (anti-CEACAM5-SN-38, 8 mg/kg) y el inhibidor de PARP rucaparib (12 mg/m²) en un programa semanal. Lo tolera bien, pero después de 3 semanas muestra neutropenia de grado 3 y diarrea de grado 1. Su cuarta infusión se pospone una semana y luego se reinstituyen las infusiones semanales, sin evidencia de diarrea o neutropenia para las siguientes 4 inyecciones. A continuación, el paciente se somete a un estudio de TC para medir el tamaño de su tumor metastásico y para ver el área original de la resección gástrica. El radiólogo mide, según los criterios RECIST, una disminución de la suma de las lesiones metastásicas, respecto al valor basal previo a la terapia combinada, del 23%. No parece haber ninguna lesión clara en el área de la resección gástrica original. El título de CEA en plasma del paciente en este momento es de 7,2 ng/ml, que está muy por debajo del valor inicial de 14,5 ng/ml. El paciente continúa con la terapia combinada semanal a las mismas dosis, y después de un total de 13 infusiones, sus estudios de TC muestran que una metástasis hepática ha desaparecido y la suma de todas las lesiones metastásicas se reduce en un 41 %, lo que constituye una respuesta parcial de RECIST. El estado general del paciente mejora y reanuda sus actividades habituales mientras continúa recibiendo una terapia de mantenimiento de 8 mg/kg 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 rango normal para un fumador, como es el caso de este paciente. Las mediciones séricas de HAHA no revelan un anticuerpo o anticuerpos anti-SN-38, por lo que la terapia parece no ser inmunogénica.

Ejemplo 24. Terapia de cáncer de mama metastásico triple negativo recidivante con IMMU-130 más veliparib

[0382] Una mujer de 58 años con cáncer de mama metastásico triple negativo tratado previamente con bevacizumab más paclitaxel, sin respuesta, presenta metástasis en varias costillas, vértebras lumbares, lesión solitaria de 3 cm de diámetro en pulmón izquierdo, con considerable hueso dolor y fatiga. Recibe terapia combinada con anti-CEACAM5 IMMU-130 (hMN-14-SN-48) más veliparib. IMMU-130 se administra a 12 mg/kg los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días, mientras que veliparib se administra una vez al día a 60 mg. Excepto por neutropenia transitoria de grado 2 y algo de diarrea inicial, tolera bien la terapia, que luego se repite, después de un descanso de 2 meses, para otro curso. El examen radiológico indica que tiene respuesta parcial por criterios RECIST, porque la suma de los diámetros de las lesiones índice disminuye en un 39%. Su estado general, incluido el dolor óseo, también mejora y vuelve casi al mismo nivel de actividad que antes de su enfermedad.

Ejemplo 25. Terapia de carcinoma de colon metastásico, generalmente refractivo, recidivante con hMN-15-SN-38 más paclitaxel

[0383] Mujer de 46 años con cáncer de colon metastásico estadio IV, con antecedente de resección de la lesión primaria que además presentaba metástasis hepáticas sincrónicas a ambos lóbulos hepáticos, así como un foco único de diseminación al pulmón derecho; estas metástasis miden, por TC, entre 2 y 5 cm de diámetro. Se somete a varios ciclos de quimioterapia durante un período de 3 años, incluidos 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, oxaliplatin, cetuximab y bevacizumab. En dos ocasiones, hay evidencia de estabilización de la enfermedad o una respuesta a corto plazo, pero no hay reducción del 30% o más de sus lesiones medidas. Su título de CEA en plasma al inicio del estudio antes de la terapia combinada es de 46 ng/mL, y sus lesiones índice totales miden una suma de 92 mm.

[0384] La terapia de combinación con hMN-15-SN-38 y paclitaxel se instituye en un ciclo de 21 días. Se administra hMN-15-SN-38 a 12 mg/kg los días 1 y 8 y paclitaxel a dosis de 135 mg/m² los días 1, 7 y 14 del ciclo. Este ciclo se repite 3 veces, con solo neutropenia transitoria y efectos secundarios gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea).

5 Sorprendentemente, a pesar de no responder a la terapia con FOLFIRI (que incluye irinotecán o CPT-11), la paciente muestra una respuesta parcial según los criterios RECIST después de completar su terapia. A continuación, se la coloca en un programa de mantenimiento de esta terapia una vez al mes durante los próximos 6 meses. Las exploraciones de seguimiento muestran que su enfermedad permanece bajo control como una respuesta parcial (RP) y, en general, la paciente se encuentra en buenas condiciones con un estado funcional de Karnofsky del 90 %.

10 **Ejemplo 26. Terapia de cáncer de ovario metastásico recidivante con IMMU-130 más olaparib**

[0385] Una mujer de 66 años con cáncer de ovario en estadio IV de FIGO positivo para mutación *BRCA1* se somete a cirugía primaria y posoperatorio de paclitaxel y carboplatino (TC). Después de un intervalo de 20 meses sin platino, la TC confirma un nivel elevado de CA125 y la recurrencia en el peritoneo. Después de un nuevo tratamiento con TC, se produce una reacción de hipersensibilidad al carboplatino, que se cambia a nedaplatino. Una respuesta completa se confirma por TC. Después de una PFI de 8 meses, se confirma un nivel sérico elevado de CA125 y recurrencia en el peritoneo y el hígado.

20 25 **[0386]** A continuación, ella recibe una terapia combinada con anti-CEACAM5 IMMU-130 (hMN-14-SN-38) más olaparib. IMMU-130 se administra a 10 mg/kg los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días, mientras que olaparib se administra a 200 mg dos veces al día los días 1 a 10 del ciclo. Excepto por neutropenia transitoria de grado 2 y algo de diarrea inicial, tolera bien la terapia, que luego se repite, después de un descanso de 2 meses, para otro curso. El examen radiológico indica que tiene respuesta parcial por criterios RECIST, porque la suma de los diámetros de las lesiones índice disminuyen en un 45%. Su estado general también mejora y vuelve casi al mismo nivel de actividad que antes de su enfermedad.

Ejemplo 27. Paciente con cáncer de colon con enfermedad metastásica en estadio IV tratado con conjugado anti-CSAp-SN-38 más paclitaxel

30 35 40 **[0387]** Esta paciente presenta metástasis de cáncer de colon en el lóbulo izquierdo del hígado y en ambos pulmones, luego de una resección de un adenocarcinoma de colon sigmoide de 9 cm, seguido de quimioinmunoterapia con FOLIFIRI y cetuximab durante 6 meses, y luego FOLFOX seguido de bevacizumab por un período adicional de aproximadamente 9 meses. Diez meses después de la resección inicial y luego del comienzo de la terapia, la enfermedad estable que se creía presente muestra 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, fatiga y anemia límitrofe, lo que sugiere una posible hemorragia interna.

45 50 **[0388]** A continuación ella recibe una terapia combinada con un conjugado SN-38 de anticuerpo hMu-9 (anti-CSAp) y paclitaxel en un ciclo de 21 días. El anticuerpo o inmunoconjunto se administra los días 1 y 8 del ciclo a dosis de 12 mg/kg, y el paclitaxel a dosis de 175 mg/m² los días 1, 7 y 14 del ciclo, que se repite para ciclos de tratamiento adicionales, midiendo sus hemogramas cada semana y recibiendo medicamentos con atropina para controlar las reacciones gastrointestinales. Se observa alopecia de grado 2 después del primer ciclo de tratamiento, pero solo neutropenia de grado 1. Después de 3 ciclos de tratamiento, su título de CEA en plasma se reduce a 19 ng/ml, y en este momento sus mediciones de TC muestran una disminución de las lesiones índice en el hígado y los pulmones en un 24,1 %. Después de 3 ciclos adicionales de terapia, muestra una reducción en la TC de las lesiones índice del 31,4 % y una reducción del tamaño de la masa suprarrenal en aproximadamente un 40 %. Se considera que este paciente responde a la terapia combinada y continúa con esta terapia. Su estado general parece haber mejorado, con menos fatiga, sin dolor o malestar abdominal y, en general, con más energía.

Ejemplo 28. Tratamiento de cáncer de páncreas metastásico con inmunoconjunto anti-MUC5ac-SN-38 más rucaparib

55 60 65 **[0389]** Este paciente de 44 años tiene antecedentes de carcinoma de páncreas metastásico, con adenocarcinoma ductal de páncreas inoperable en la cabeza del páncreas, y que muestra metástasis en los lóbulos izquierdo y derecho del hígado, el primero mide 3 x 4 cm y el segundo mide 2 x 3 cm. El paciente recibe un curso de gemcitabina pero no muestra una respuesta objetiva. Cuatro semanas después, recibe terapia combinada con hPAM4-SN-38 iv a una dosis de 8 mg/kg dos veces por semana durante 2 semanas, con una semana de descanso, más rucaparib (12 mg/m²) una vez por semana. Esto se repite durante otros 2 ciclos. Los estudios de TC se realizan una semana después y muestran una reducción total en la masa tumoral (todos los sitios) del 32 % (respuesta parcial), junto con una caída en el título de CA19-9 en sangre de 220 al inicio a 75 en el momento de la evaluación radiológica. El paciente muestra solo náuseas y vómitos de grado 1 después de cada tratamiento y una neutropenia de grado 2 al final del último ciclo de tratamiento, que se resuelve 4 semanas después. No se administra premedicación para prevenir las reacciones a la infusión.

Ejemplo 29. Uso de anti-CD74 hLL1-SN-38 más oliparib para tratar el cáncer de colon metastásico refractario a la terapia (mCRC)

5 [0390] El paciente es un hombre de 67 años que presenta cáncer de colon metastásico. A continuación, de la colectomía transversa 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 sigue un régimen adyuvante de FOLFOX para un total de 10 ciclos de FOLFOX.

10 [0391] 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 no diana incluyeron varias masas hipoatenuadas en el hígado. El CEA inicial es de 685 ng/mL.

15 [0392] A continuación se trata al paciente con milatuzumab anti-CD74 conjugado con SN-38 (hLL1-SN38) en combinación con oliparib. hLL1-SN-38 (10 mg/kg) se administra los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días, mientras que oliparib se administra a 200 mg dos veces al día los días 1 a 10 del ciclo. El paciente experimenta náuseas (Grado 2) y fatiga (Grado 2) durante el primer ciclo y continúa el tratamiento sin mayores eventos adversos. La primera evaluación de respuesta realizada (después de 3 ciclos) muestra una reducción de la lesión objetivo en un 26 % mediante tomografía computarizada (TC) y su nivel de CEA disminuye a 245 ng/mL. En la segunda evaluación de respuesta (después de 8 ciclos), la lesión diana se ha reducido en un 35 %. Su salud general y sus síntomas clínicos han mejorado considerablemente.

Ejemplo 30. Tratamiento de leucemia linfocítica crónica recidivante con IMMU-114-SN-38 y paclitaxel

20 [0393] Un hombre de 67 años con antecedentes de LLC, según la definición del Taller Internacional sobre Leucemia Linfocítica Crónica y las clasificaciones de la Organización Mundial de la Salud, presenta recaída de la enfermedad después de terapias previas con fludarabina, dexametasona y rituximab, así como un régimen de CVP. Ahora tiene fiebre y sudores nocturnos asociados con un agrandamiento generalizado de los ganglios linfáticos, una producción reducida de hemoglobina y plaquetas, así como un recuento de leucocitos que aumenta rápidamente. Su LDH está elevado y la beta-2-microglobulina es casi el doble de lo normal. El paciente recibe terapia con conjugado anti-HLA-DR IMMU-114-SN-38 (IgG4 hL243-SN-38) en combinación con paclitaxel en un ciclo de 21 días. Se administra IMMU-114-SN-38 a 8 mg/kg los días 1 y 8 y se administra paclitaxel a dosis de 175 mg/m² los días 1, 7 y 14 del ciclo, luego se repite el ciclo. Después de 4 ciclos, la evaluación muestra que los parámetros hematológicos del paciente mejoran y sus células de LLC circulantes parecen estar disminuyendo en número. La terapia se reanuda por otros 3 ciclos, después de lo cual sus valores hematológicos y de laboratorio indican que tiene una respuesta parcial.

Ejemplo 31. Tratamiento de paciente con linfoma folicular con hA19-SN-38, rucaparib y paclitaxel

25 [0394] Varón de 60 años que consulta por dolor abdominal y presencia de masa palpable. El paciente tiene estudios de TC y FDG-PET que confirman la presencia de la masa con adenopatías patológicas en el mediastino, axilas y ganglios del cuello. Las pruebas de laboratorio son normales excepto por LDH elevado y beta-2-microglobulina. La 30 biopsia de médula ósea revela varios agregados linfoides paratrabeculares y perivasculares. Estos son linfocíticos con expresión de CD20, CD19 y CD10 por inmunotinción. El diagnóstico final es linfoma folicular de grado 2, estadio IVA, con una puntuación FLIPI de 4. El diámetro más largo del ganglio afectado más grande es de 7 cm. El paciente recibe una terapia combinada con un anticuerpo monoclonal IgG (hA19) anti-CD19 humanizado conjugado con SN-38, más rucaparib y paclitaxel, en un ciclo de 21 días. El ADC se administra a 6 mg/kg los días 7 y 14, rucaparib a 10 mg/m² los días 1, 8 y 15 y paclitaxel a 125 mg/m² los días 1, 7 y 14 del ciclo. Después de 5 ciclos, las evaluaciones de la 35 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 beta-2-microglobulina también disminuyen.

Ejemplo 32. Tratamiento de LLA de células B precursoras en recaída con hA20-SN-38 más olaparib

40 [0395] Esta mujer de 51 años ha estado en tratamiento para LLA de células B precursoras con cromosoma Filadelfia negativo, que muestra la tinción de células de LLA para CD19, CD20, CD 10, CD38 y CD45. Más del 20% de los 45 linfoblastos de la médula y la sangre expresan CD19 y CD20. El paciente había recibido tratamiento previo con clofarabina y citarabina, lo que resultó en una toxicidad hematológica considerable, pero sin respuesta. También se inició un ciclo de citarabina en dosis altas (ara-C), pero el paciente no pudo tolerarlo. Se le administra hA20-SN-38 (veltuzumab-SN-38) y oliparib en un ciclo de 21 días, con dosis de hA20-SN-38 por infusión de 6 mg/kg los días 7 y 14 y oliparib a 200 mg dos veces al día en los días 1-10 del ciclo.

50 [0396] Despues de 3 ciclos, sorprendentemente, muestra una mejoría en los recuentos de sangre y médula, suficientes para determinar una respuesta parcial. Despues de un descanso de 2 meses debido a la neutropenia (Grado 3), la terapia se reanuda durante otros 4 cursos. En este momento, ha mejorado mucho y se está considerando una terapia de mantenimiento para tratar de llevarla a una etapa en la que pueda ser candidata para un trasplante de células madre.

Ejemplo 33. Tratamiento de linfoma con Anti-CD22-SN-38 más paclitaxel

[0397] El paciente es un hombre de 62 años con linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) recidivante. Después de 6 cursos de quimioinmunoterapia RCHOP, ahora presenta una diseminación extensa de los ganglios linfáticos en los ganglios linfáticos mediastino, axilar e inguinal. Se le administra anti-CD22 epratuzumab-SN-38 más paclitaxel en un ciclo de 21 días. El ADC se administra a dosis de 12 mg/kg los días 1 y 7 y el paclitaxel se administra a 175 mg/m² los días 1, 7 y 14 del ciclo. Después de 3 ciclos, se evalúa al paciente mediante tomografía computarizada y se mide la masa tumoral total y muestra una disminución del 35 % (respuesta parcial), que parece mantenerse durante los siguientes 3 meses. Los efectos secundarios son solo trombocitopenia y náuseas y vómitos de grado 1 después del tratamiento, que se resuelven en 2 semanas. No se administra preterapia para reducir las reacciones a la infusión.

Ejemplo 34. Terapia de primera línea de linfoma folicular usando veltuzumab-SN-38 y rucaparib

[0398] La paciente es una mujer de 41 años que presenta linfoma folicular de bajo grado, con ganglios linfáticos cervicales y axilares bilaterales medibles (2-3 cm cada uno), masa mediastínica de 4 cm de diámetro y agrandamiento del bazo. Se le administra veltuzumab-SN-38 (anti-CD20-SN-38) en combinación con rucaparib, administrándose ADC a 10 mg/kg el día 1 y rucaparib a 12 mg/m² los días 1, 8 y 15. Después 4 ciclos, sus medidas tumorales por TC muestran una reducción del 80%. A continuación, recibe 2 cursos adicionales de terapia y las mediciones de TC indican que se logró una respuesta completa. Esto se confirma mediante imágenes FDG-PET.

Ejemplo 35. Producción y uso de pro-2-pirrolinodoxorrubicina (P2PDox)

[0399] Se sintetizó pro-2-pirrolinodoxorrubicina (P2PDox) y se conjugó con anticuerpos como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 8.877.202. Los ADC P2PDox ejemplares se describen en la Tabla 16 a continuación.

Tabla 16. Conjugados de anticuerpo P2PDox de ejemplo

	Conjugado	Lote	% Recuperación de proteína	P2PDox/IgG	HPLC	
					Agregado	Fármaco libre
1	hIMMU-31-P2PDox	II22-138	75,0%	7,39	1,9%	0,26%
2	hA20-P2PDox	II22-135	85,7%	6,79	<2%	<0,1%
3	hLL1-P2PDox	II22-145	88,6%	7,10	2,8%	0,2%
4	hRS7-P2PDox	II22-142	80,1%	7,17	1,8%	0,12%
5	hMN15-P2PDox	II22-180	74,9%	6,87	1,1%	0,46%
6	hMN-14-P2PDox	II22-183	80,2%	6,78	2,1%	0,53%

[0400] También se prepararon conjugados para hPAM4-P2PDox, hLL2-P2PDox y RFB4-P2PDox, con una recuperación y pureza de proteínas similares (no se muestra).

[0401] Estudios de unión celular *in vitro*: La retención de la unión del anticuerpo se confirmó mediante ensayos de unión celular que compararon la unión del conjugado con el anticuerpo no conjugado (Chari, 2008, Acc Chem Res 41:98-107). La potencia del conjugado se probó en un ensayo MTS de 4 días usando células diana apropiadas. El conjugado hRS7-P2PDox exhibió valores IC_{50} de 0,35-1,09 nM en líneas celulares de cáncer humano gástrico (NCI-N87), pancreático (Capan-1) y de mama (MDA-MB-468), con el fármaco libre exhibiendo 0,02-0,07 potencia nM en las mismas líneas celulares.

[0402] Estabilidad del suero: La estabilidad del suero del conjugado prototípico de P2PDox, hRS7-P2PDox, se determinó incubando en suero humano a una concentración de 0,2 mg/mL a 37 °C. El incubado se analizó mediante HPLC usando una columna de cromatografía de interacción hidrófoba de butilo (HIC) en el que hubo una buena separación del tiempo de retención entre el pico debido al fármaco libre y el debido al conjugado o a las especies de mayor peso molecular. Este análisis mostró que no hubo liberación de fármaco libre del conjugado, lo que sugiere una alta estabilidad sérica del conjugado. Cuando se repitió el mismo experimento con el conjugado hRS7-doxorrubicina, que contenía el mismo enlace escindible que hRS7-P2PDox, y donde se verificó de forma independiente que el fármaco libre se liberaba con una vida media de 96 h, se observó una formación clara del pico del fármaco libre, a saber pico de doxorubicina, se observó en HIC HPLC.

[0403] Sorprendentemente, se determinó que el conjugado de P2PDox se sujetaba firmemente al anticuerpo porque entrecruzaba las cadenas peptídicas del anticuerpo. El entrecruzamiento estabiliza la unión del fármaco al anticuerpo para que el fármaco solo se libere intracelularmente después de que se haya metabolizado el anticuerpo. El entrecruzamiento ayuda a minimizar la toxicidad, por ejemplo, la cardiotoxicidad, que resultaría de la liberación del fármaco libre en circulación. El uso anterior de conjugados peptídicos 2-PDox fracasó porque el fármaco entrecruzaba el péptido con otras proteínas o péptidos *in vivo*. Con los presentes conjugados, el P2PDox se une a grupos disulfuro tiol intercatenarios mientras está en forma de profármaco. La protección del profármaco se elimina rápidamente *in vivo*

poco después de la inyección y la porción 2-PDox resultante del conjugado entrecruza las cadenas peptídicas del anticuerpo, formando un entrecruzamiento intramolecular dentro de la molécula del anticuerpo. Esto estabiliza el ADC y evita el entrecruzamiento con otras moléculas en circulación.

5 **EJEMPLO 34. Estudios *in vivo***

[0404] General - El tamaño del tumor se determinó mediante mediciones con calibre de longitud (L) y ancho (W) con el volumen del tumor calculado como $(L \times W^2)/2$. Se midieron los tumores y se pesaron los ratones dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron si sus tumores alcanzaban un tamaño $> 1 \text{ cm}^3$, perdían más del 15 % de su peso corporal inicial o se volvían moribundos de otro modo. El análisis estadístico para los datos del crecimiento del tumor se basó en el área bajo la curva (AUC) y el tiempo de supervivencia. Los perfiles de crecimiento tumoral individual se obtuvieron a través de modelos de curvas lineales. Se empleó una prueba *t* para determinar la igualdad de varianza entre grupos antes del análisis estadístico de las curvas de crecimiento. Se utilizó una prueba *t* de dos colas para evaluar la significación estadística entre todos los diversos grupos de tratamiento y los controles no específicos. Para el análisis de control de solución salina, se usó una prueba *t* de una cola para evaluar la significación. Los estudios de supervivencia se analizaron utilizando diagramas de Kaplan-Meier (análisis de rango logarítmico), utilizando el paquete de software Prism GraphPad Software (v4.03) (Advanced Graphics Software, Inc.; Encinitas, CA). Todas las dosis en los experimentos preclínicos se expresan en cantidades de anticuerpos. En términos de fármaco, 100 μg de anticuerpo (5 mg/kg) en un ratón de 20 g, por ejemplo, transporta 1,4 μg -2,8 μg (0,14-0,17 mg/kg) de dosis equivalente de P2PDox cuando se usa un ADC con 3-6 fármacos/IgG.

[0405] Una sola dosis i.v. de $\geq 300 \text{ mg}$ [$\sim 10 \mu\text{g}$ de P2PDox] del conjugado fue letal, pero todos los animales toleraron 4 dosis de 45 μg administradas en 2 semanas. Usando este régimen de dosificación, examinamos el efecto terapéutico de hRS7-P2PDox en 2 modelos de xenoinjerto de tumor humano, Capan-1 (cáncer de páncreas) y NCI-N87 (cáncer gástrico). La terapia comenzó 7 días después del trasplante del tumor en ratones desnudos. En el modelo Capan-1 establecido de 7 días de edad, el 100 % de los tumores establecidos retrocedieron rápidamente, sin evidencia de nuevo crecimiento (no mostrado). Este resultado se reprodujo en un experimento repetido (no mostrado). Se hicieron hallazgos similares en el modelo NCI-N87 establecido (no mostrado), donde un segundo curso de terapia, administrado después del día 70, se toleró con seguridad y condujo a regresiones adicionales del tumor residual (no mostrado). El conjugado de hRS7-SN-38 internalizado, dirigido a Trop-2, proporcionó mejores respuestas terapéuticas que un conjugado de un anticuerpo anti-CEACAM5 de internalización deficiente, hMN-14 (no mostrado). Un ADC anti-CD20 no dirigido, hA20-P2PDox, fue ineficaz, lo que indica una eficacia terapéutica selectiva (no se muestra). Los datos de un xenoinjerto de cáncer de mama (MDA-MB-468) y un segundo xenoinjerto de cáncer de páncreas (no mostrado) reiteran la misma tendencia de los efectos antitumorales significativos y específicos del conjugado.

[0406] PK y toxicidad de hRS7-P2PDox con sustituciones de 6,8 o 3,7 fármaco/IgG: Se sabe que los conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC) que contienen hasta 8 fármacos ultratóxicos/MAb se eliminan más rápido que los MAb no modificados y aumentan la toxicidad fuera del objetivo, un hallazgo que ha llevado a las tendencias actuales de utilizar sustituciones de fármacos de ≤ 4 (Hamblett et al., 2004, Clin Cancer Res 10:7063-70). Los conjugados se prepararon y evaluaron con proporciones medias de sustitución de fármaco/MAb (MSR) de $\sim 6:1$ y $\sim 3:1$. Se administraron grupos de ratones normales ($n = 5$), i.v., dosis únicas de hRS7 o hRS7-P2PDox sin modificar con sustitución de fármaco de 6,8 o 3,7 (misma dosis de proteína), y se recogieron muestras de suero a los 30 min, 4 h, 24 h, 72 h y 168 h después de la inyección. Estos fueron analizados por ELISA para determinar la concentración de anticuerpos (no mostrado). No hubo diferencias significativas en las concentraciones séricas en varios momentos, lo que indica que estos se eliminaron de manera similar. Los parámetros farmacocinéticos (Cmax, AUC, etc.) fueron similares. Los conjugados con mayor o menor sustitución de fármaco tuvieron una tolerabilidad similar en ratones desnudos, cuando se administraron a la misma dosis de fármaco conjugado.

[0407] Eficacia terapéutica a la dosis mínima eficaz (MED): El conjugado de anticuerpo anti-TROP-2, hRS7-P2PDox, se evaluó en ratones desnudos que portaban xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87 mediante la administración de una dosis única de proteína en bolo de 9 mg/kg, 6,75 mg/kg, 4,5 mg/kg, 2,25 mg/kg o 1 mg/kg. La terapia se inició cuando el volumen tumoral medio (mTV) fue de $0,256 \text{ cm}^3$. El día 21, el mTV en el grupo de control de solución salina (grupo sin tratamiento) fue de $0,801 \pm 0,181 \text{ cm}^3$, que fue significativamente mayor que el de los ratones tratados con una dosis de 9, 6,75, 4,5 o 2,25 mg/kg con un mTV de $0,211 \pm 0,042 \text{ cm}^3$, $0,239 \pm 0,0,054 \text{ cm}^3$, $0,264 \pm 0,087 \text{ cm}^3$, y $0,567 \pm 0,179 \text{ cm}^3$, respectivamente ($P < 0,0047$, prueba *t* de una cola). A partir de estos, se consideró que la dosis efectiva mínima era de 2,25 mg/kg, mientras que 9 mg/kg representaban MTD.

[0408] MTD del anticuerpo-P2PDox: un estudio de MTD que comparó los conjugados 2-PDox y P2PDox del anticuerpo prototípico, hLL1, en ratones demostró que el conjugado P2PDox era mucho más potente (no se muestra). La MTD de una única inyección iv estuvo entre 100 y 300 mg. A continuación, se determinó la MTD de inyecciones múltiples, en un programa de cada cuatro días para un total de cuatro inyecciones (q4dx4), usando dosis de proteína entre 25 μg y 150 μg por inyección. A estas dosis, se administró a los animales una dosis acumulativa de entre 100 y 600 μg . **Tabla 17** a continuación resume los diversos grupos.

Tabla 17. Dosis y horario para MTD de anticuerpo-P2PDox

12 ratones desnudos atípicos hembra			
Grupo	N	Tratamiento	Cantidad total
1	3	25 mg i.v. q4dx4	100 µg
2	3	50 mg i.v. q4dx4	200 µg
3	3	100 mg i.v. q4dx4	400 µg
4	3	150 mg i.v. q4dx4	600 µg

[0409] Sólo aquellos ratones tratados con 25 µg de P2PDox-ADC continúan sin mostrar signos de toxicidad (no mostrado). Esta es una dosis acumulativa de 100 µg que también fue la dosis tolerada cuando se administró como una inyección única (no se muestra). Por lo tanto, la MTD para inyecciones múltiples de un P2PDox-ADC en ratones es de 25 µg q4dx4 de este experimento. Un análisis más detallado de los datos y la repetición del experimento establecieron que la MTD para la dosificación fraccionada era de 45 µg de dosis de proteína del conjugado, administrada cada 4 días durante 2 semanas (programa de 45 µg, q4dx4).

[0410] Estudios de unión: no se observaron diferencias significativas en la unión del resto del anticuerpo a las células de carcinoma gástrico NCI-N87 entre hRS7 no conjugado y P2PDox-hRS7 conjugado con 6 moléculas de P2PDox por anticuerpo (no se muestra). La falta de efecto de la conjugación sobre la unión del anticuerpo al antígeno diana se confirmó para los conjugados P2PDox-hMN-15 (antiCEACAM6), P2PDox-hLL2 (anti-CD22) y P2PDox-hMN-24 (anti-CEACAM5). Se concluye que la conjugación de P2PDox a anticuerpos no afecta la actividad de unión antígeno-anticuerpo.

[0411] Estudios de citotoxicidad: se examinó la citotoxicidad de los conjugados P2PDox-mAb para las células diana. hRS7-P2PDox y hMN-15-P2PDox fueron citotóxicos para las líneas celulares de tumor sólido MDA-MB-468, AG S, NCI-N87 y Capan-1 (no se muestra). hMN-14-P2PDox fue citotóxico para las líneas tumorales pancreáticas humanas Capan-1, BxPC-3 y AsPC-1 y las líneas tumorales gástricas y colónicas humanas AGS, NCI-N87 y LS147T (no mostrado). hLL2-P2PDox fue citotóxico para las líneas tumorales hematopoyéticas Daudi, Raji, Ramos y JVM-3 (no mostrado). Los valores IC_{50} para los conjugados estaban en el rango de concentración nanomolar (no mostrado).

EJEMPLO 35. Estudios *in vivo* adicionales

[0412] Se realizaron más estudios de eficacia *in vivo* en ratones desnudos implantados con xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87 (no mostrado). Un ciclo de tratamiento con 4 x 45 µg de hRS7-P2PDox hizo retroceder rápidamente todos los tumores (no mostrado). Se inició un segundo ciclo de tratamiento aproximadamente 2 meses después del final del primer ciclo, lo que resultó en una regresión completa de todos menos uno de los animales tratados con hRS7-P2PDox. Los conjugados hA20, hLL1 y hMN-14 tuvieron poco efecto sobre la progresión tumoral (no mostrado). La administración de P2PDox-hMN-15 dio como resultado una regresión retardada del cáncer gástrico, que fue menos eficaz que el conjugado hRS7.

[0413] Se examinó el efecto de variar el programa de dosificación sobre la eficacia antitumoral (no mostrado). El experimento comenzó 9 días después de la implantación del tumor cuando el volumen tumoral medio para todos los grupos fue de $0,383 \text{ cm}^3$ y finalizó el día 93 (84 días después del inicio de la terapia). En este estudio, una dosis única de 180 µg, dos dosis semanales de 90 µg y q4dx4 de 45 µg dieron como resultado una supervivencia significativamente mejorada (no se muestra). Para el control de solución salina, sobrevivieron 0 de 9 ratones (no se muestra). Para los ratones que recibieron 45 µg q4dx4 de hRS7-P2PDox, 8 de 9 ratones estaban vivos el día 94 (no se muestra). Para los ratones que recibieron 90 µg semanales x 2 de hRS7-P2PDox, 9 de 9 ratones estaban vivos el día 94 (no se muestra). Para los ratones que recibieron una dosis única de 180 µg de hRS7-P2PDox, 8 de 9 ratones estaban vivos el día 94 (no se muestra). Con el mismo programa de dosificación, el conjugado de hA20 de control no tuvo efecto sobre la supervivencia (no se muestra). Un estudio de toxicidad mostró que los tres programas de dosificación de hRS7-P2PDox dieron como resultado niveles de toxicidad igualmente bajos (no se muestra).

[0414] El conjugado hRS7-P2PDox también fue efectivo en el cáncer de páncreas Capan-1 (no mostrado) y fue más efectivo para inhibir el crecimiento tumoral que un conjugado hRS7-SN-38 (no mostrado). El conjugado hPAM4-P2PDox también fue más eficaz para inhibir el crecimiento del cáncer de páncreas humano Capan-1 que un conjugado hPAM4-SN-38 (no mostrado). A los 63 días después de la inyección del tumor Capan-1 (con la terapia comenzando 1 día después de la inoculación), 0 de 10 ratones estaban vivos en el control de solución salina, 10 de 10 ratones estaban vivos en los ratones tratados dos veces por semana x 2 semanas con 45 µg de hPAM4-P2PDox, 2 de 10 ratones estaban vivos en ratones tratados dos veces por semana x 2 semanas con 45 µg de hA20-P2PDox, 0 de 10 ratones estaban vivos en ratones tratados dos veces por semana x 4 semanas con 250 µg de hPAM4-SN-38, y 0 de 10 ratones estaban vivos en ratones tratados dos veces por semana x 4 semanas con 250 µg de h20-SN-38.

[0415] hRS7-P2PDox fue sustancialmente más eficaz que hRS7-SN-38 para inhibir el crecimiento del cáncer de páncreas PxPC-3 (no se muestra) y fue ligeramente más eficaz que hRS7-SN-38 para inhibir el crecimiento del cáncer de mama MDA-MB-468 (no se muestra).

5 **[0416]** Se examinó el efecto de diferentes dosis únicas de hRS7-P2PDox sobre el crecimiento de xenoinjertos de carcinoma gástrico NCI-N87. Usando una dosis única, el efecto máximo sobre el crecimiento tumoral se observó a 90 mg o más (no se muestra). Una dosis única de 45 mg fue el mínimo requerido para ver un beneficio de supervivencia significativo en comparación con el control de solución salina (no se muestra).

10 **[0417]** La actividad ADCC de varios conjugados hRS7-ADC se determinó en comparación con hRS7 IgG (no se muestra). Las PBMC se purificaron a partir de sangre adquirida en el Centro de Sangre de Nueva Jersey. Se usó una línea celular de adenocarcinoma de páncreas humano Trop-2-positiva (BxPC-3) como línea celular diana con una proporción de efector a diana de 100:1. La ADCC mediada por hRS7 IgG se comparó con hRS7-Pro-2-PDox, hRS7-CL2A-SN-38 y hRS7-NEM reducida y protegida. Todos se usaron a 33,3 nM. La actividad general fue baja, pero 15 significativa (no se muestra). Hubo una lisis específica del 8,5% para hRS7 IgG que no fue significativamente diferente de hRS7-Pro-2-PDox. Ambos fueron significativamente mejores que el control hLL2 y hRS7-NEM y hRS7-SN-38 ($P < 0,02$, prueba t de dos colas). No hubo diferencia entre hRS7-NEM y hRS7-SN-38.

Ejemplo 36. Tratamiento de linfoma no Hodgkin (LNH) con anti-CD22 P2PDox-epratuzumab más oliparib

20 **[0418]** Se prepara un ADC de P2PDox-epratuzumab como se describe anteriormente. Diecisiete pacientes con antecedentes no tratados o LNH recidivante reciben 4 dosis de 70, 100 o 150 mg de P2PDox-epratuzumab inyectados i.v. en los días 1 y 14 de un ciclo de 28 días. Oliparib a 200 mg al día se administra los días 1-7 y 14-21 del ciclo. Las 25 respuestas se evalúan mediante tomografías computarizadas, con otras evaluaciones que incluyen eventos adversos, niveles sanguíneos de células B, niveles séricos de epratuzumab y títulos de antiepratuzumab humano (HAHA).

30 **[0419]** Solo se observan reacciones de inyección transitorias ocasionales, de leves a moderadas, y no se observan otros problemas de seguridad, excepto neutropenia hasta el Grado 3 (pero reversible después de interrumpir el tratamiento hasta que se reduce al Grado 1). Se observa un agotamiento transitorio de células B (hasta aproximadamente un 25 %) en todos los niveles de dosificación de P2PDox-epratuzumab en combinación con oliparib. La tasa de respuesta objetiva (respuestas parciales más respuestas completas más respuestas completas no confirmadas) es del 47 % (8/17) con una tasa de respuesta completa/respuesta completa no confirmada del 24 % (4/17). Cuatro de las ocho respuestas objetivas continúan durante 30 semanas o más. Se observan respuestas objetivas en todos los niveles de dosis de P2PDox-epratuzumab más oliparib. Todas las muestras de suero evaluadas 35 para anticuerpos humanos anti-epratuzumab (HAHA) son negativas.

Ejemplo 37. Tratamiento de cáncer de mama triple negativo con P2PDox-hRS7 más paclitaxel

40 **[0420]** El ADC anti-Trop-2 P2PDox-hRS7 se prepara como se describe anteriormente. Los pacientes con cáncer de mama triple negativo que han fracasado en al menos dos terapias estándar reciben 70 mg de P2PDox-hRS7 inyectados por vía i.v. el día 1 de un ciclo de 21 días, con paclitaxel administrado a 175 mg/m² los días 1, 7 y 14 del ciclo. Ciclo. Después de 3 ciclos, se observan respuestas objetivas, con una disminución promedio del volumen tumoral del 35%. Todas las muestras de suero evaluadas para anticuerpos humanos anti-hRS7 (HAHA) son negativas.

45 **Ejemplo 38. Tratamiento de cáncer de colon metastásico con P2PDox-hMN-14 más olaparib**

50 **[0421]** Un hombre de 52 años con cáncer de colon metastásico (3-5 cm de diámetro) en los lóbulos hepáticos izquierdo y derecho, así como una metástasis de 5 cm en el pulmón derecho y un valor elevado de CEA en sangre de 130 ng/mL, es tratados con la combinación de anti-CEACAM5 hMN-14-P2PDox más olaparib. Se administra una dosis de 150 mg de hMN-14-P2PDox los días 1 y 14 de un ciclo de 28 días. Oliparib se administra a 200 mg dos veces al día en los días 1-10 del ciclo. Tras la evaluación por TC después de 2 ciclos, se mide una reducción del 25 % de los diámetros medios totales de las 3 lesiones diana, lo que constituye una buena respuesta estable de la enfermedad según los criterios RECIST1.1. Al mismo tiempo, su título de CEA en sangre se reduce a 30 ng/mL. Los cursos 55 repetidos de terapia continúan a medida que su neutropenia se normaliza.

Ejemplo 39. Almacenamiento de inmunoconjungados

60 **[0422]** Los conjugados de ADC se purificaron y se intercambió el tampón con ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), pH 6,5, y se formularon posteriormente con trehalosa (concentración final de 25 mM) y polisorbato 80 (concentración final de 0,01 % v/v), siendo la concentración de tampón final de 22,25 mM como resultado de la adición del excipiente. Los conjugados formulados se liofilizan y almacenan en viales sellados, con almacenamiento a 2 °C-8 °C. Los inmunoconjungados liofilizados son estables en las condiciones de almacenamiento y mantienen sus 65 actividades fisiológicas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inmunoconjungado que se une a Trop-2 para su uso en un método para tratar el cáncer que expresa Trop-2, en el que el método comprende:
- 10 a) administrar el inmunoconjungado a un sujeto humano con cáncer; y
b) administrar al sujeto al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de PARP y un inhibidor de microtúbulos
en el que el inmunoconjungado comprende un anticuerpo anti-Trop-2 conjugado con SN-38.
- 15 2. Al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de PARP y un inhibidor de microtúbulos, para usar en un método para tratar el cáncer que expresa Trop-2, en el que el método comprende:
- 20 a) administrar a un sujeto humano con el cáncer un inmunoconjungado que se une a Trop-2; y
b) administrar al sujeto al menos un agente terapéutico
en el que el inmunoconjungado comprende un anticuerpo anti-Trop-2 conjugado con SN-38.
- 25 3. El inmunoconjungado para uso de la reivindicación 1 y el al menos un agente terapéutico para uso de la reivindicación 2, donde la combinación de anticuerpo o inmunoconjungado y agente terapéutico tiene un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento tumoral.
- 30 4. El inmunoconjungado para el uso de la reivindicación 1 y el al menos un agente terapéutico para el uso de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo anti-Trop-2 es hRS7.
- 35 5. El inmunoconjungado para uso de la reivindicación 1 y el al menos un agente terapéutico para uso de la reivindicación 2, donde el inhibidor de PARP se selecciona del grupo que consiste en olaparib, talazoparib (BMN-673), rucaparib, veliparib, CEP 9722, MK 4827, BGB-290, ABT-888, AG014699, BSI-201, CEP-8983 y 3-aminobenzamida; o el inhibidor de microtúbulos se selecciona del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un taxano, un maitansinoide, una auristatina, vincristina, vinblastina, paclitaxel, mertansina, demecolcina, nocodazol, epotilona, docetaxel, disodermolida, colchicina, combrestatina, podofilotoxina, CI-980, fenilahistinas, esteganacinas, curacinas, 2-metoxiestradiol, E7010, metoxibencenosulfonamidas, vinorelbina, vinflunina, vindesina, dolastatinas, espongistatina, rizoxina, tasidotina, halicondrinas, criptoficina 52, MMAE y mesilato de eribulina.
- 40 6. El inmunoconjungado para uso de la reivindicación 5 y el al menos un agente terapéutico para uso de la reivindicación 5, en el que el inhibidor de PARP es olaparib; o el inhibidor de microtúbulos es paclitaxel o mesilato de eribulina.
- 45 7. El inmunoconjungado para el uso de la reivindicación 1 y el al menos un agente terapéutico para el uso de la reivindicación 2, en el que el cáncer es un tumor sólido y el tratamiento da como resultado una reducción del tamaño del tumor de al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos el 30%, o al menos el 40%.
- 50 8. El inmunoconjungado para el uso de la reivindicación 1 y el al menos un agente terapéutico para el uso de la reivindicación 2, en el que el cáncer es metastásico y el método comprende además reducir el tamaño o eliminar las metástasis.
- 55 9. El inmunoconjungado para uso de la reivindicación 1 y el al menos un agente terapéutico para uso de la reivindicación 2, en el que el cáncer es refractario a otras terapias pero responde a la combinación de conjugado de anticuerpo-fármaco y agente terapéutico.
- 60 10. El inmunoconjungado para uso de la reivindicación 9 y el al menos un agente terapéutico para uso de la reivindicación 9, en el que el paciente no ha respondido a la terapia con irinotecan, antes del tratamiento con el conjugado de anticuerpo-fármaco.
- 65 11. El inmunoconjungado para el uso de la reivindicación 1 y el al menos un agente terapéutico para el uso de la reivindicación 2, en el que el método comprende además administrar al sujeto una o más modalidades terapéuticas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos no conjugados, anticuerpos radiomarcados, anticuerpos conjugados por fármaco, anticuerpos conjugados con toxina, terapia génica, quimioterapia, péptidos terapéuticos, terapia con citocinas, oligonucleótidos, radioterapia localizada, cirugía y terapia con ARN de interferencia.
12. El inmunoconjungado para el uso de la reivindicación 11 y el al menos un agente terapéutico para el uso de la reivindicación 11, donde la modalidad terapéutica comprende el tratamiento con un agente seleccionado del grupo que consiste en 5-fluorouracilo, afatinib, apidina, azaribina, anastrozol, antraciclinas, axitinib, AVL-101, AVL-291, bendamustina, bleomicina, bortezomib, bosutinib, briostatina-1, busulfán, caliqueamicina, camptotecina, carboplatino,

10-hidroxicamptotecina, carmustina, celebrex, clorambucilo, cisplatino (CDDP), inhibidores de la Cox-2, irinotecán (CPT-11), SN-38, carboplatino, cladribina, camptotecas, ciclofosfamida, crizotinib, citarabina, dacarbazina, dasatinib, dinaciclib, docetaxel, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina (2P-DOX), cianomorfolino doxorrubicina, glucurónido de doxorrubicina, glucurónido de epirrubicina, erlotinib, estramustina, epidofilotoxina, erlotinib, entinostat, agentes de unión al receptor de estrógeno, etopósido (VP16), glucurónido de etopósido, fosfato de etopósido, exemestano, fingolimod, flavopiridol, floxuridina (FUdR), 3',5' -O-dioleoil-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, fostamatinib, ganetespib, GDC-0834, GS-1101, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, ibrutinib, idarrubicina, idelalisib, ifosfamida, imatinib, L-asparaginasa, lapatinib, lenolidamida, leucovorina, LFM-A13, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, navelbina, neratinib, nilotinib, nitrosurea, olaparib, plicomicina, procarbazina, paclitaxel, PCI-32765, pentostatina, PSI-341, raloxífeno, semustina, sorafenib, estreptozocina, SU11248, sunitinib, tamoxifeno, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecán, uracilo mostaza, vatalanib, vinorelbina, vinblastina, vincristina, alcaloides de la vinca y ZD1839.

15 13. El inmunoconjuguado para el uso de la reivindicación 1 y el al menos un agente terapéutico para el uso de la reivindicación 2, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio cáncer, cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer renal, próstata cáncer y cáncer colorrectal.

FIG. 1A

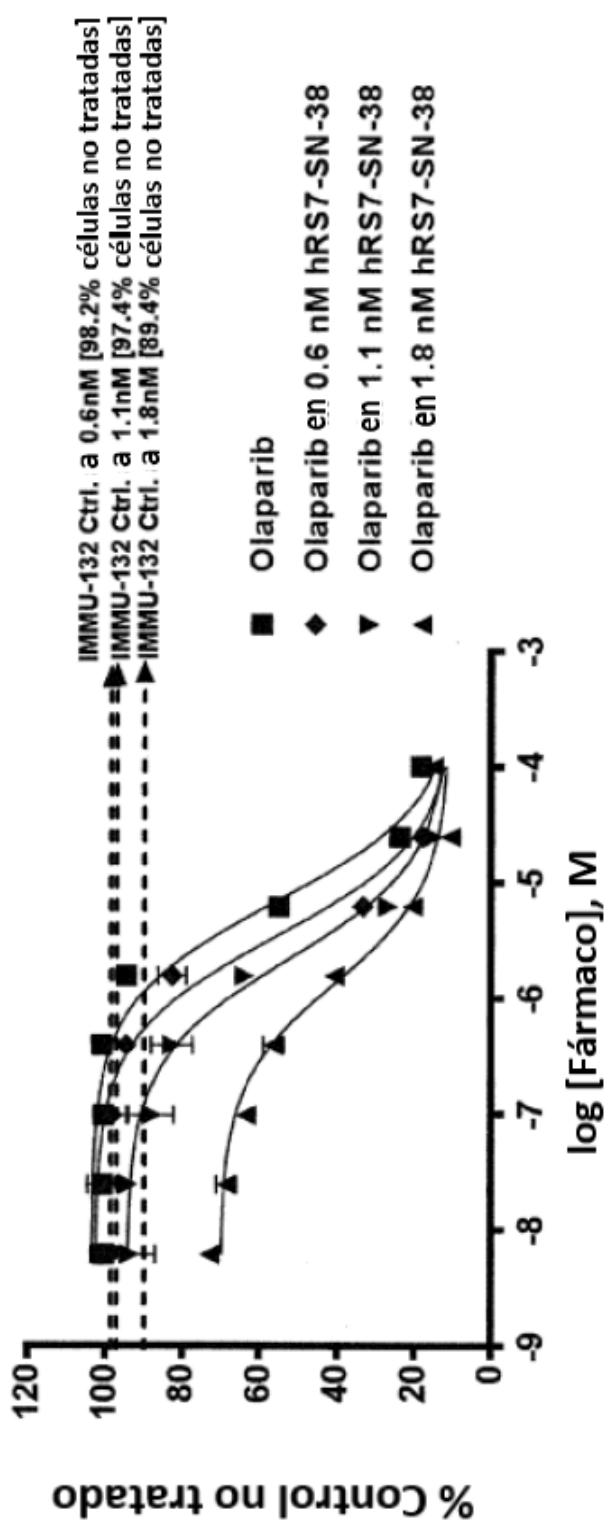


FIG. 1B

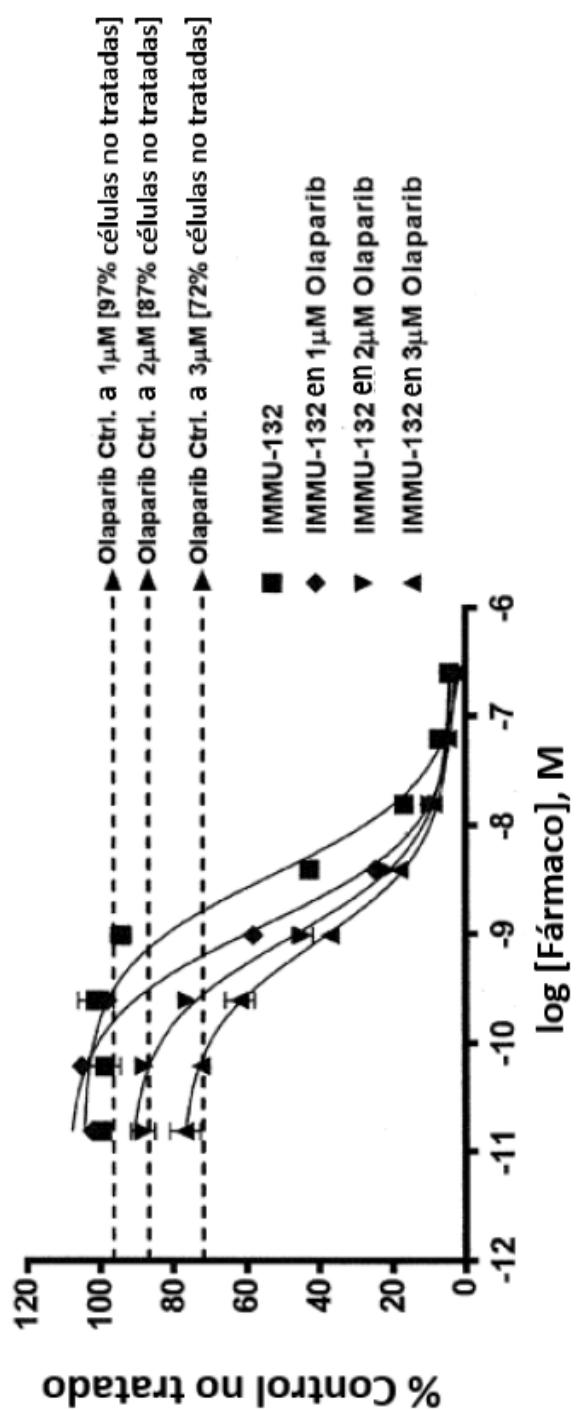


FIG. 1C

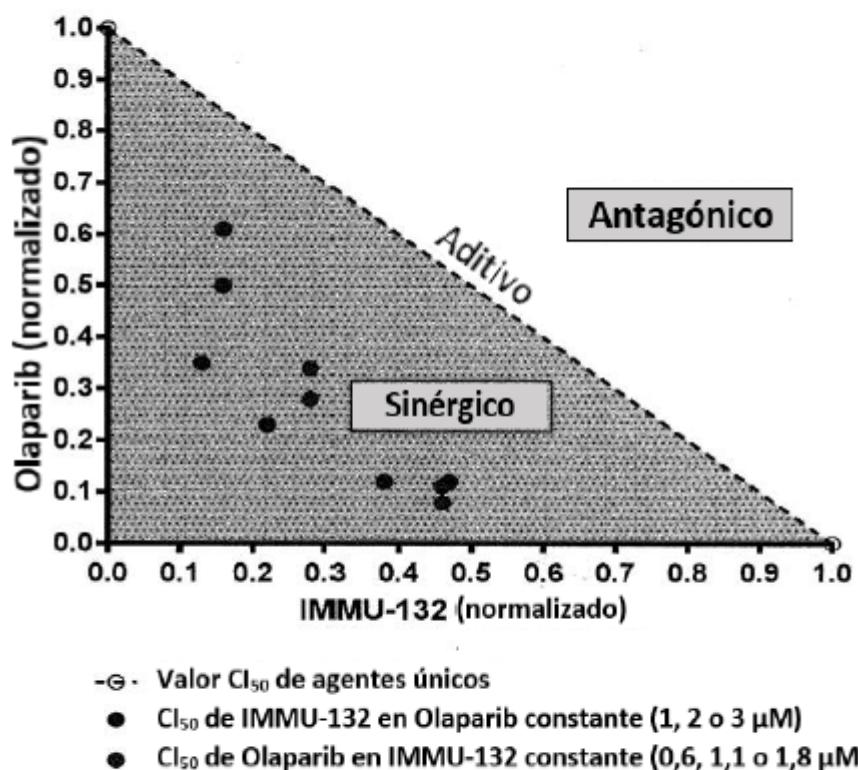


FIG. 2A

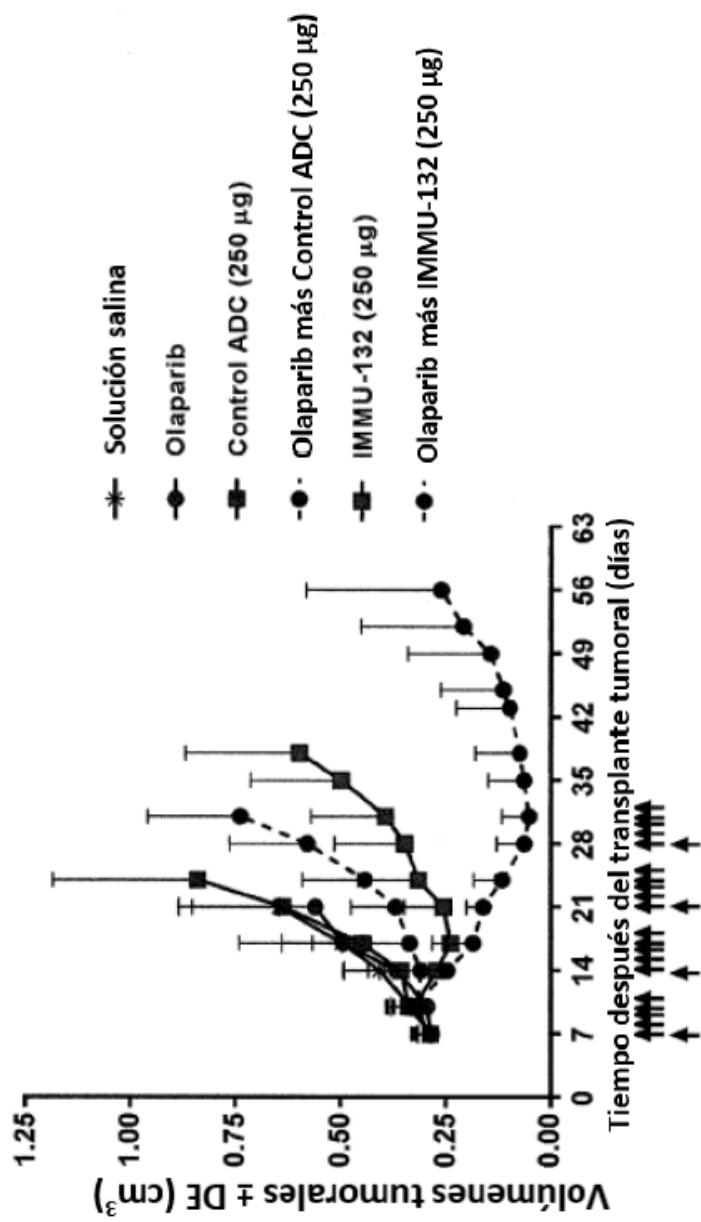


FIG. 2B

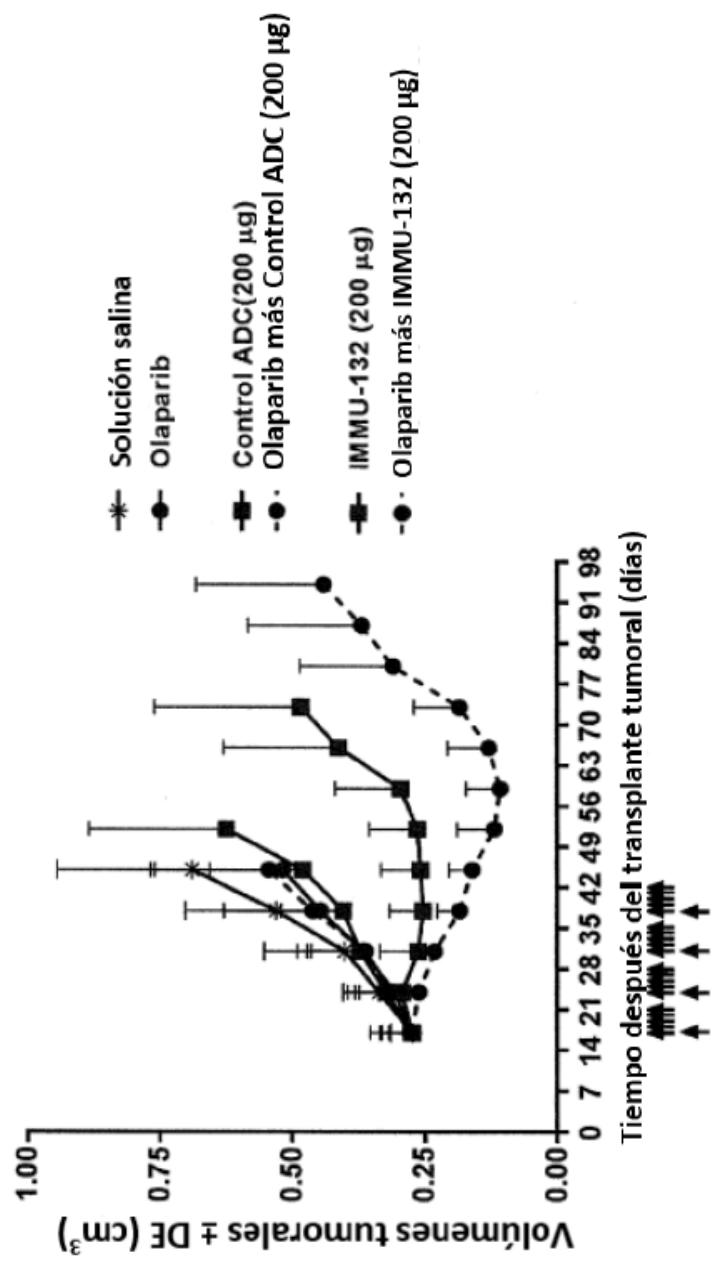


FIG. 3A

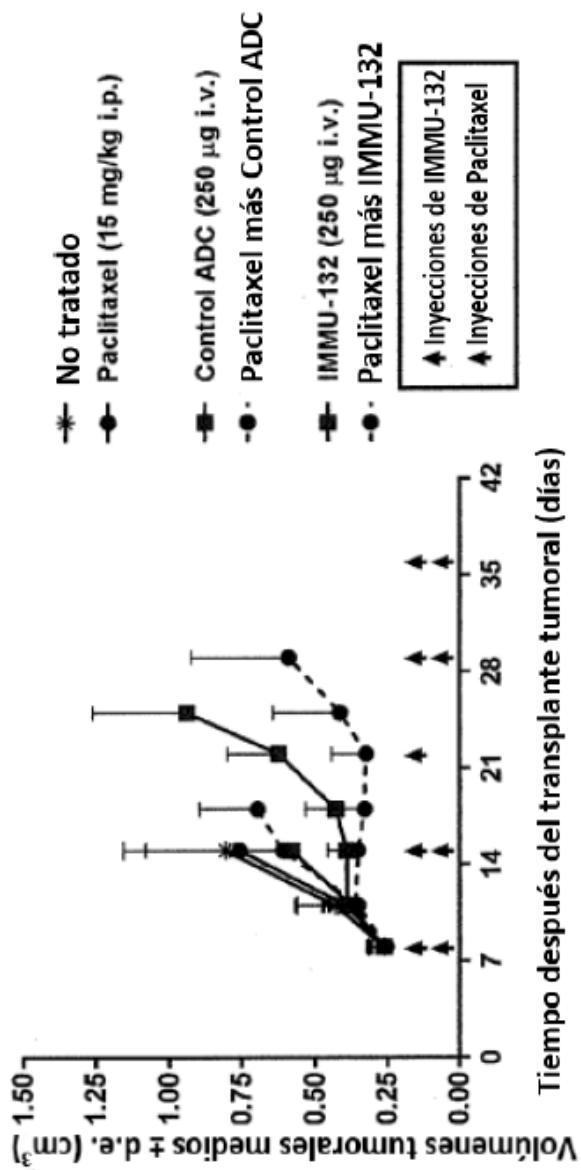


FIG. 3B

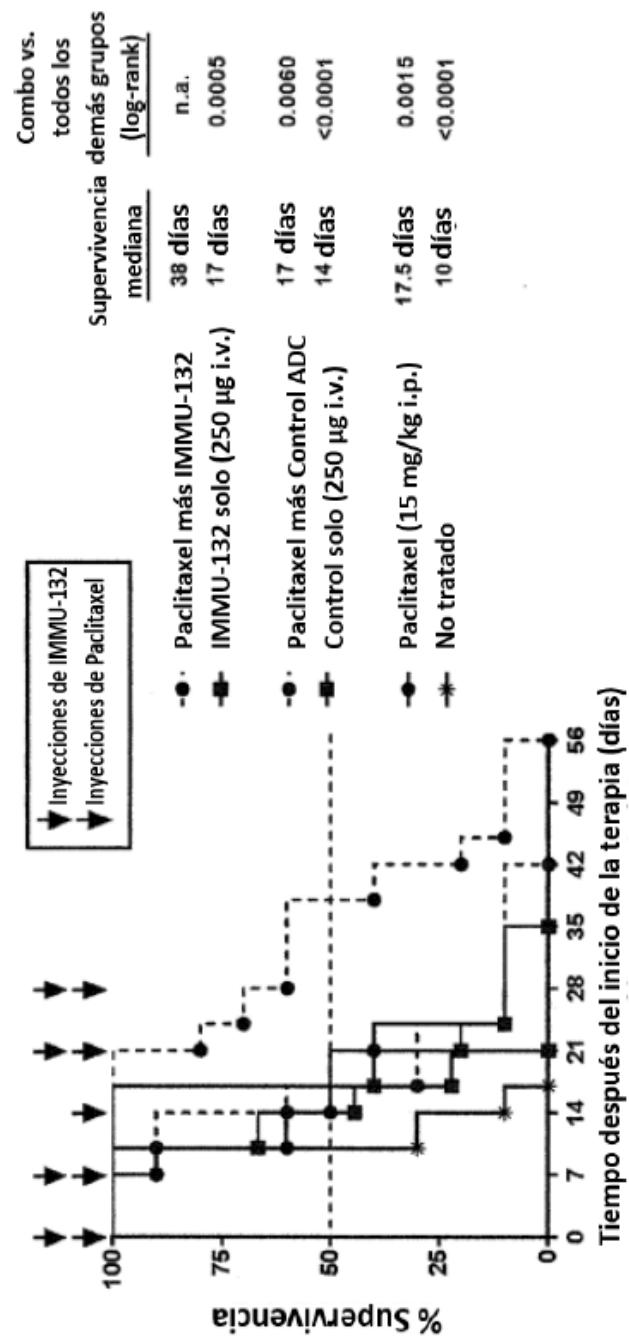


FIG. 3C

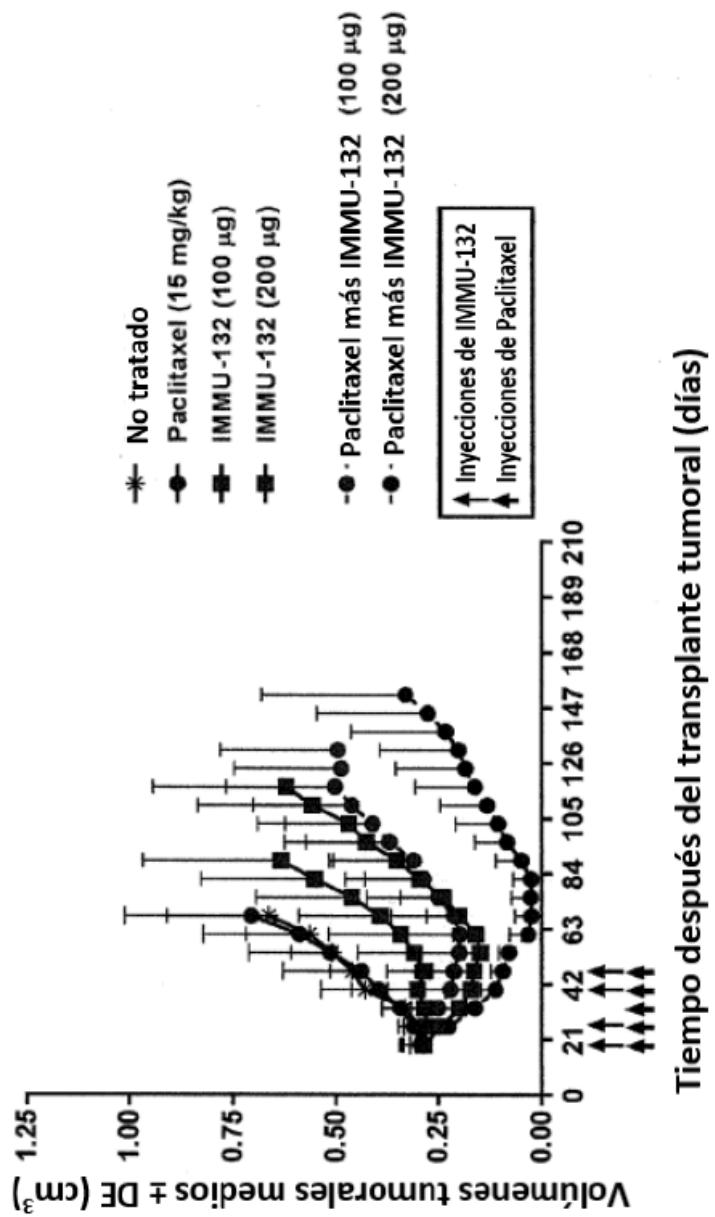


FIG. 3D

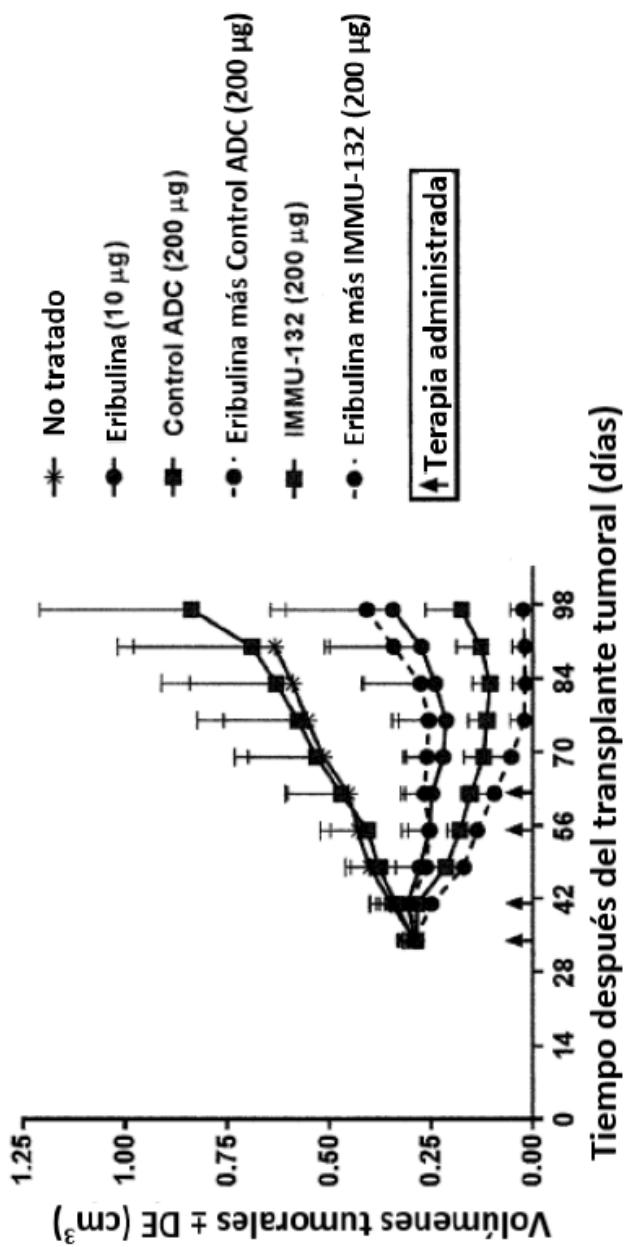


FIG. 3E

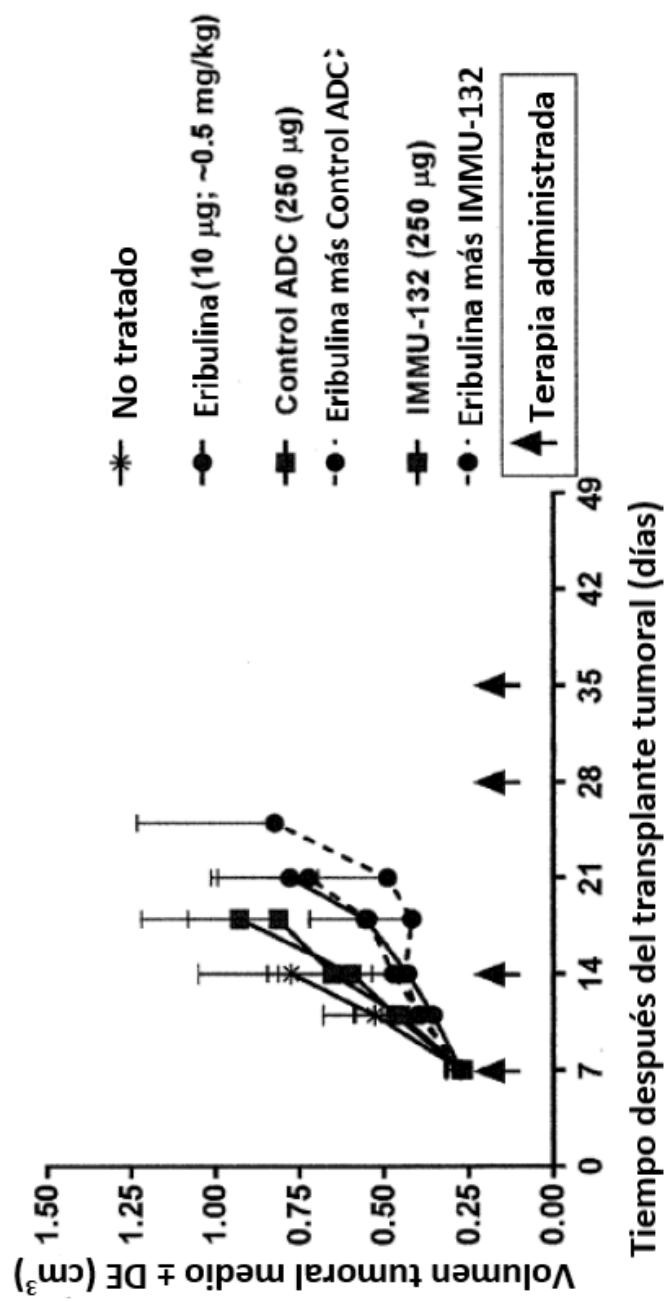


FIG. 3F

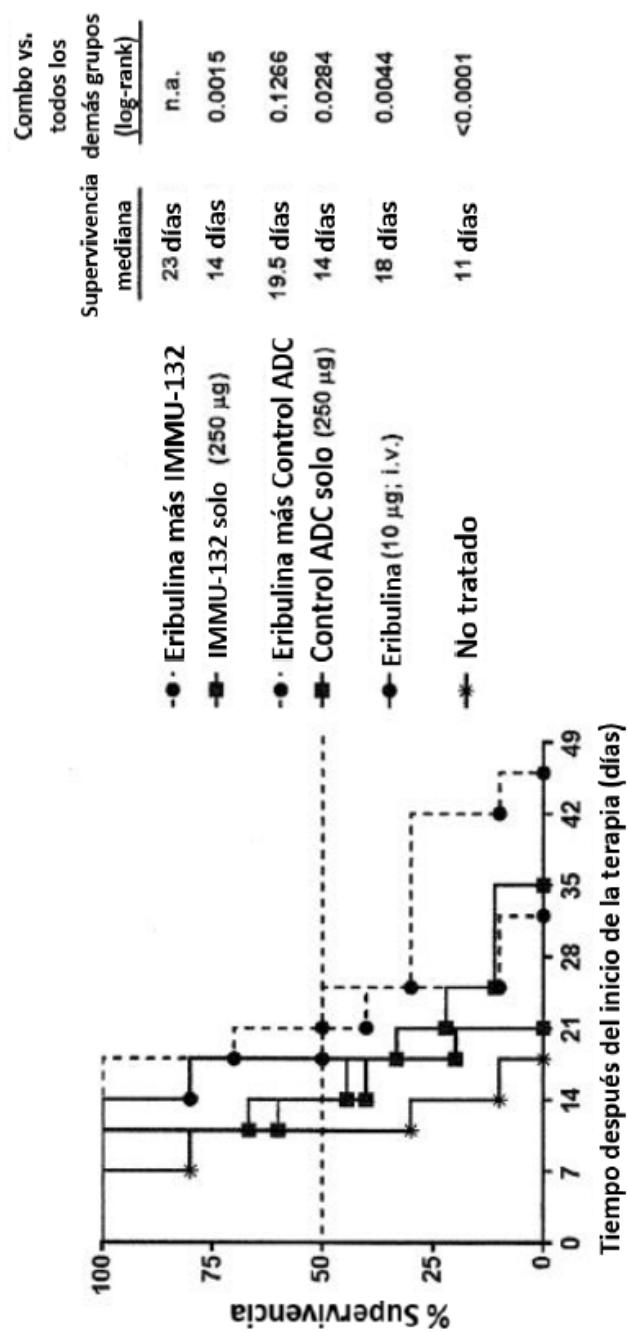


FIG. 4

Línea celular	Agente único IC_{50} (nM)	Dosis/respuesta + Cantidad Constante (IC_{10} , IC_{20} , IC_{30})			
		IMMU-132 + Olaparib	IMMU-132 + Olaparib + IMMU- 132	CI ^c	
MDA-MB-468 (<i>PTEN</i> defectuoso)	3.87	8,696	1.46 ^a 0.84 ^a 0.51 ^a	4,389 ^b 2,442 ^b 709 ^b	0.8820 0.4979 0.2133
MDA-MB-231 (<i>BRCA1</i> /2 w.t.)	5.19	28,803	1.89 ^a 0.51 ^a 0.19 ^a	16,679 ^b 5,695 ^b 3,382 ^b	0.9432 0.2960 0.1540
HCC1806 (<i>BRCA1</i> /2 defectuoso)	1.89	5,883	0.87 ^a 0.67 ^a 0.45 ^a	4,112 ^b 3,980 ^b 1,450 ^b	1.1593 1.0310 0.4846
HCC38 (<i>BRCA1</i> /2 defectuoso)	3.08	7,954	0.76 ^a 0.61 ^a	593 ^b 157 ^b	0.7528 0.3213 0.2178

FIG. 5A

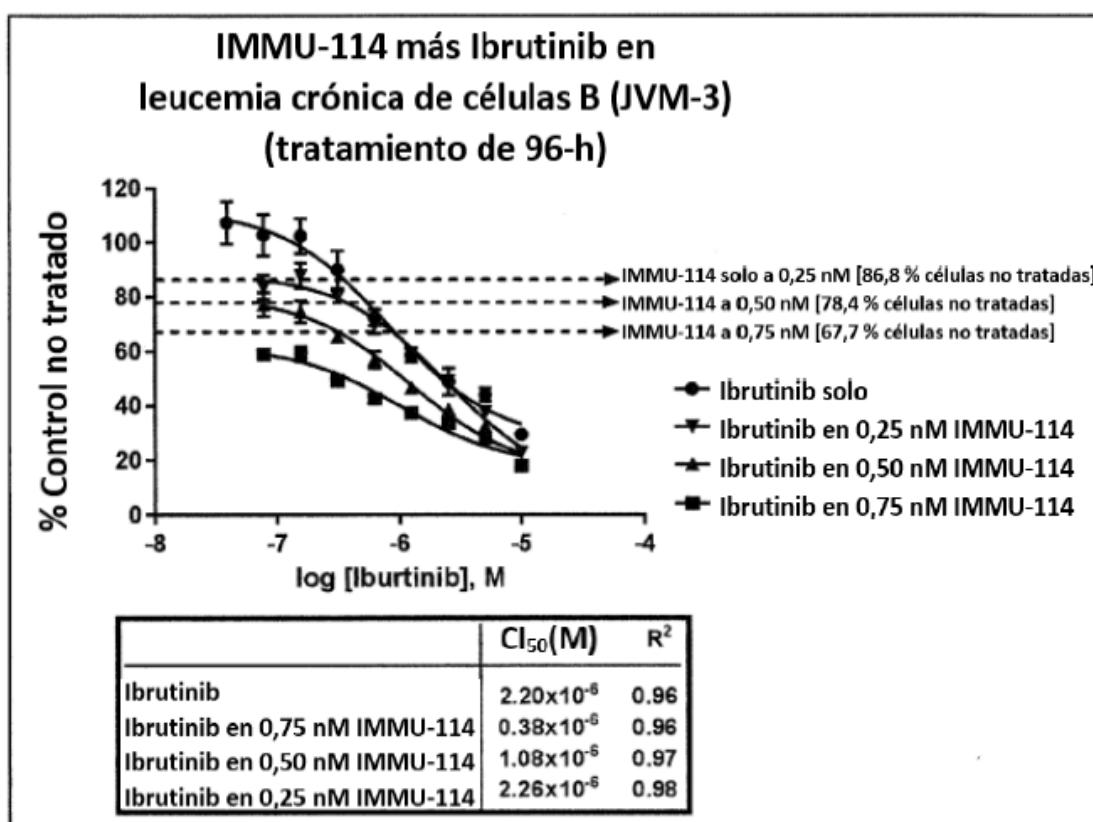


FIG. 5B

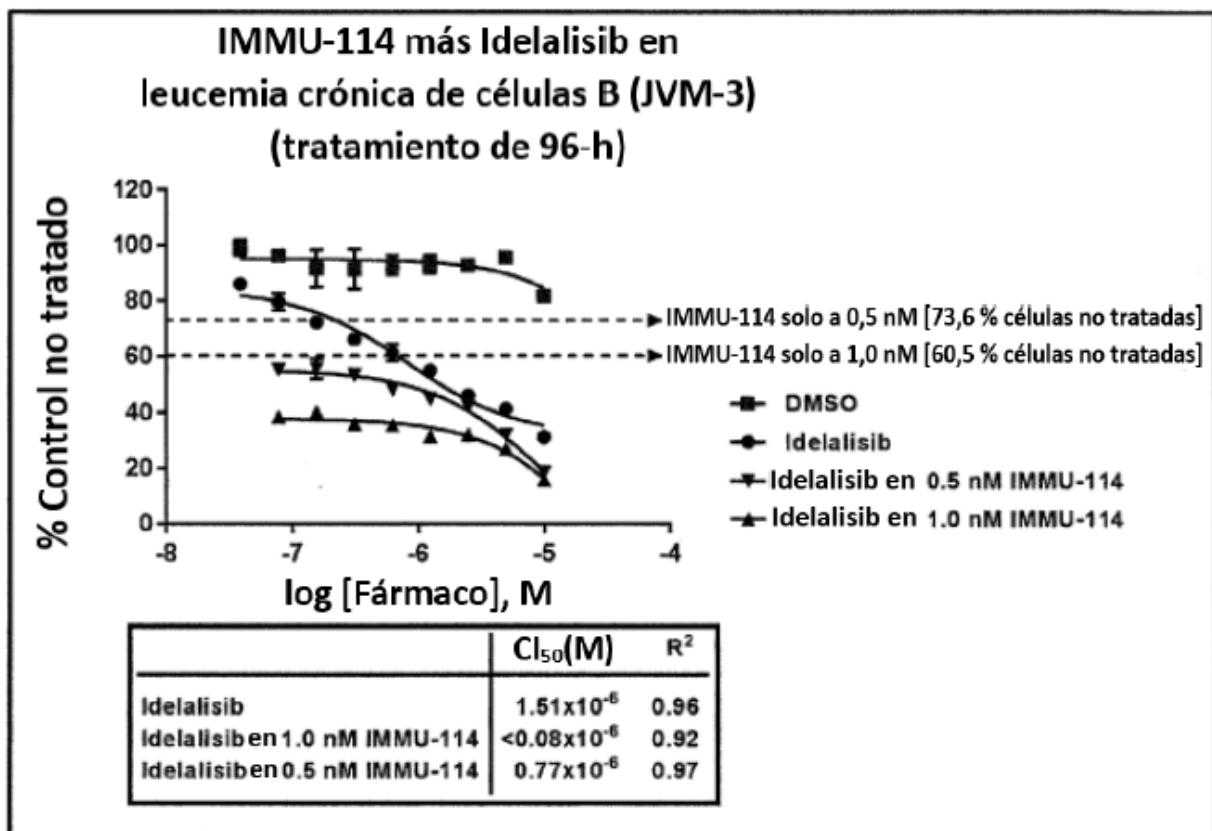


FIG. 6A
Ibrutinib + IMMU-114

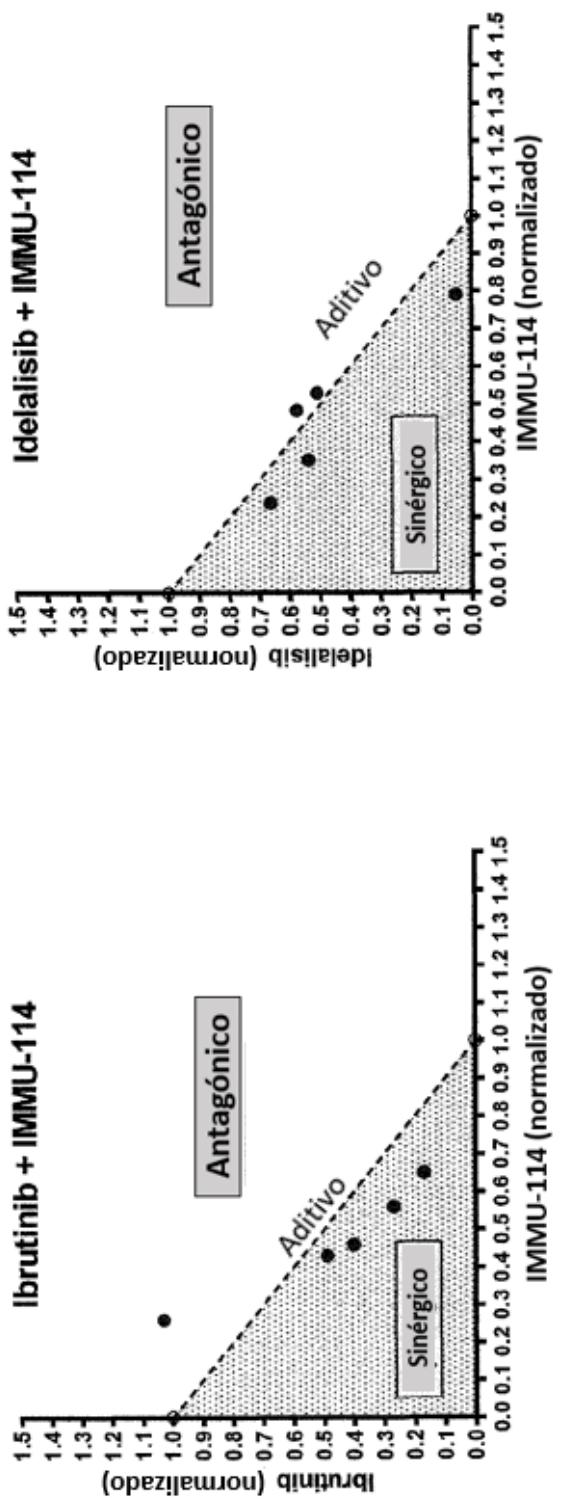


FIG. 6B
Idelalisib + IMMU-114

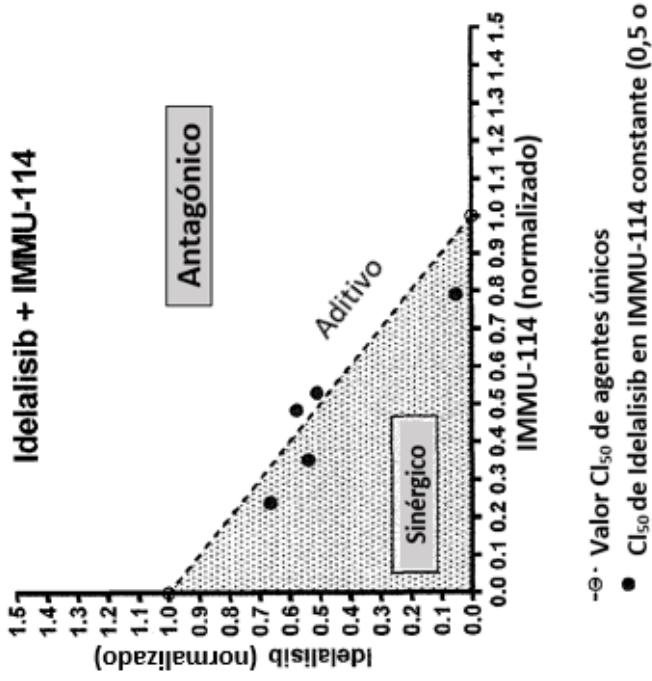


FIG. 7

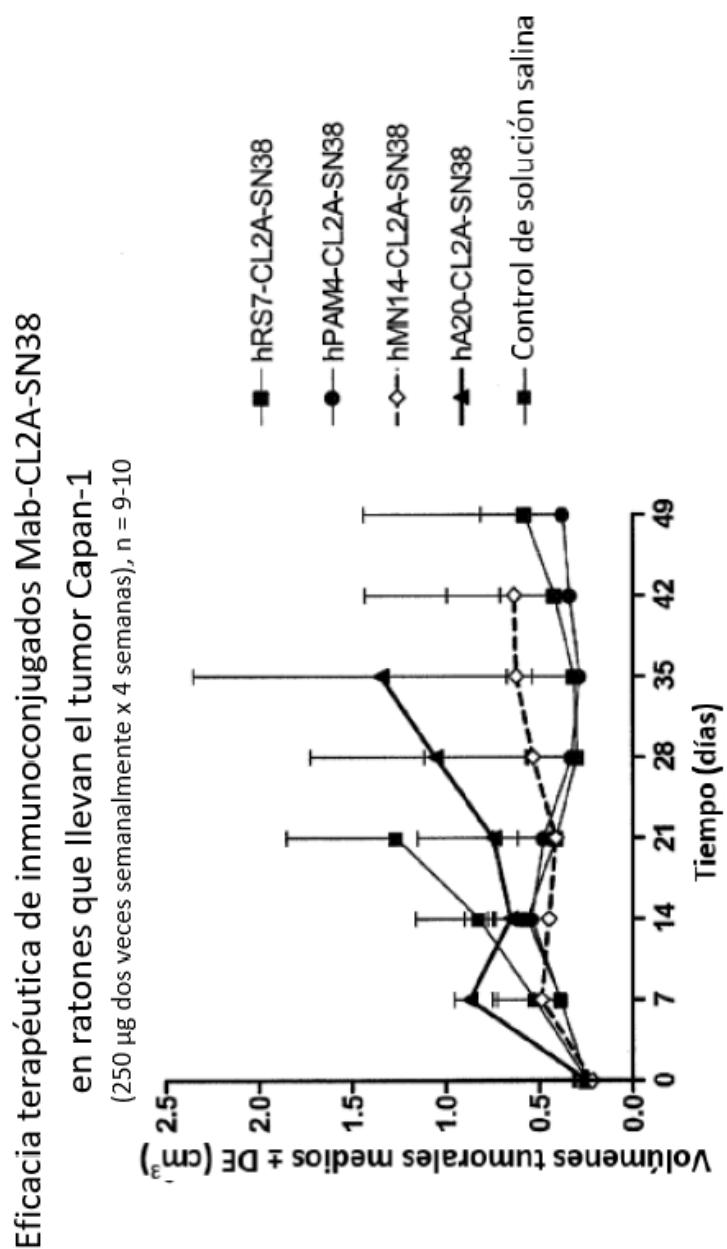
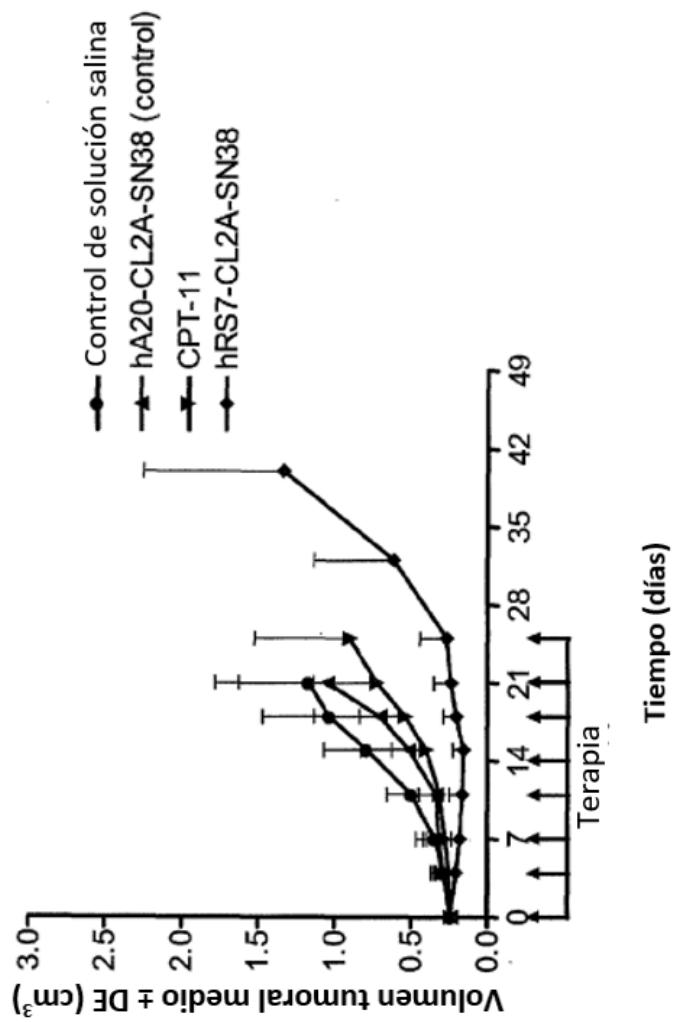


FIG. 8
 Eficacia terapéutica de inmunoconjungados Mab-CL2A-SN38 en ratones que llevan el xenoinjerto de adenocarcinoma pancreático humano (BxPC-3) (500 µg dos veces semanalmente x 4 semanas), n = 10



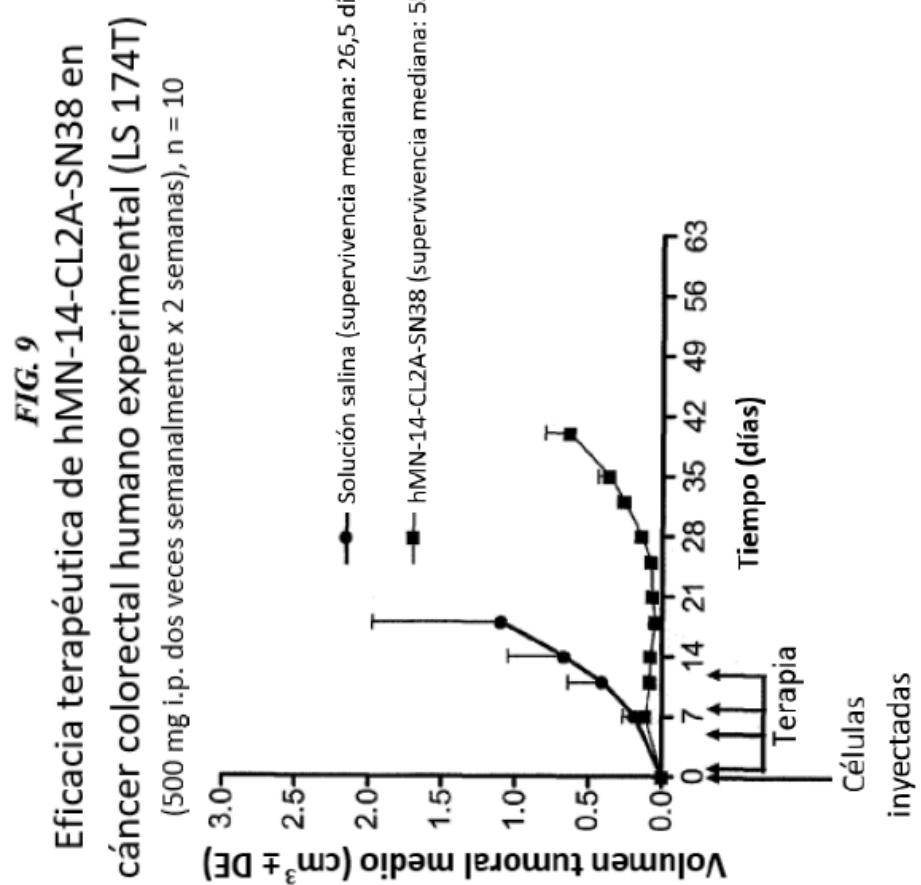


FIG. 10

Curvas de supervivencia de ratones tratados con hMN14-CL-SN38
que llevan la enfermedad metastática pulmonar GW-39
(i.p. q4dx8)

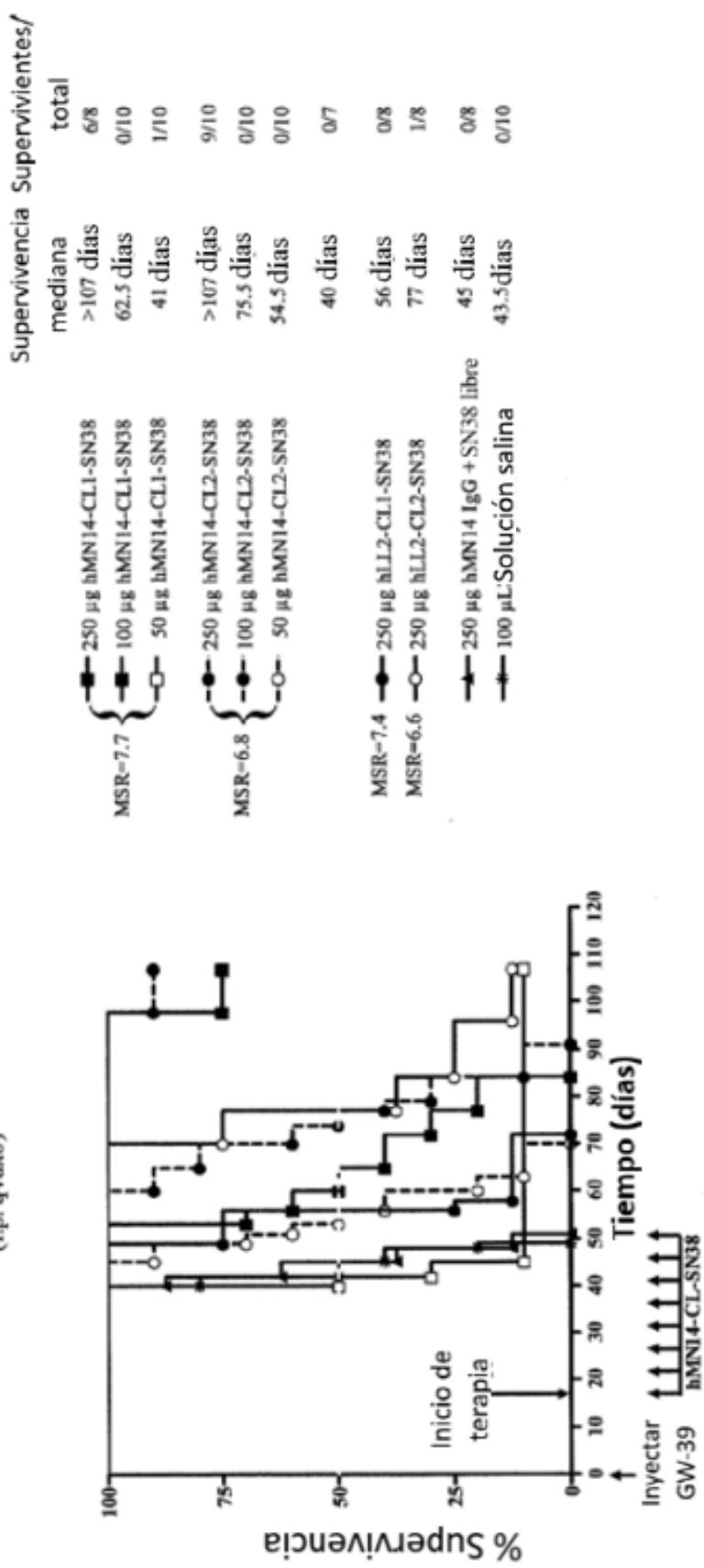


FIG. 11A

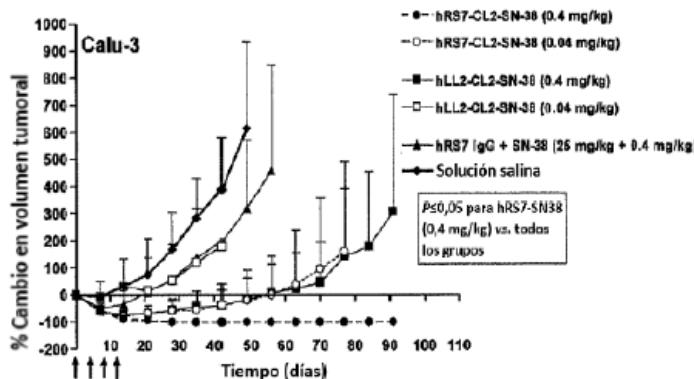


FIG. 11B

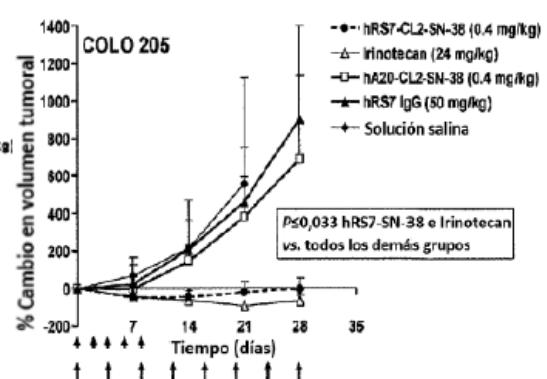


FIG. 11C

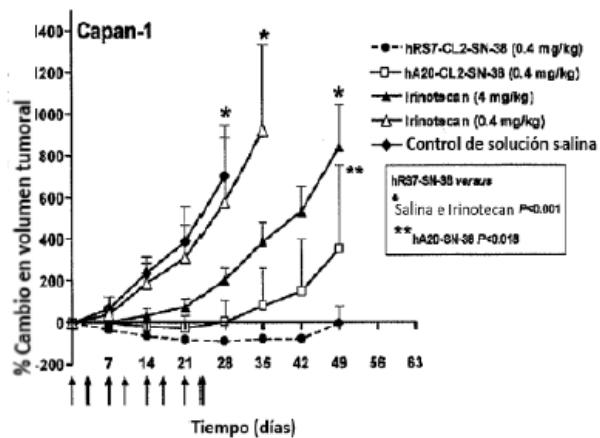


FIG. 11D

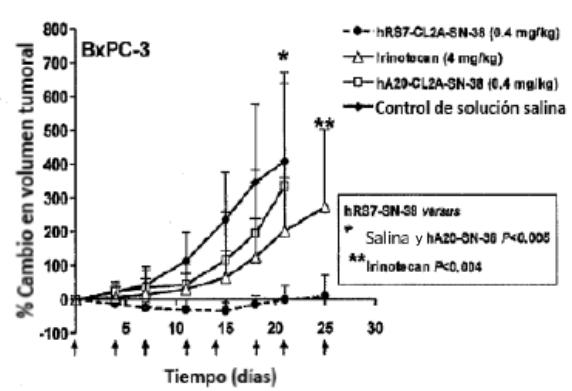
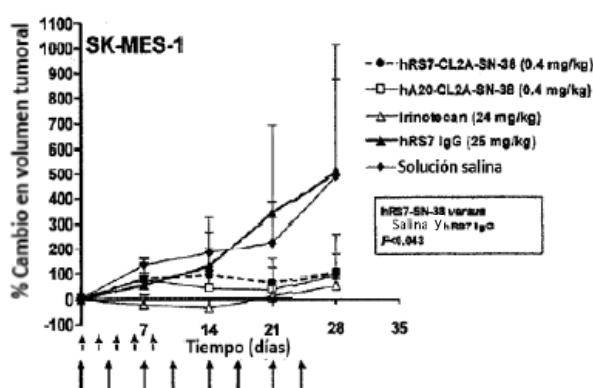


FIG. 11E



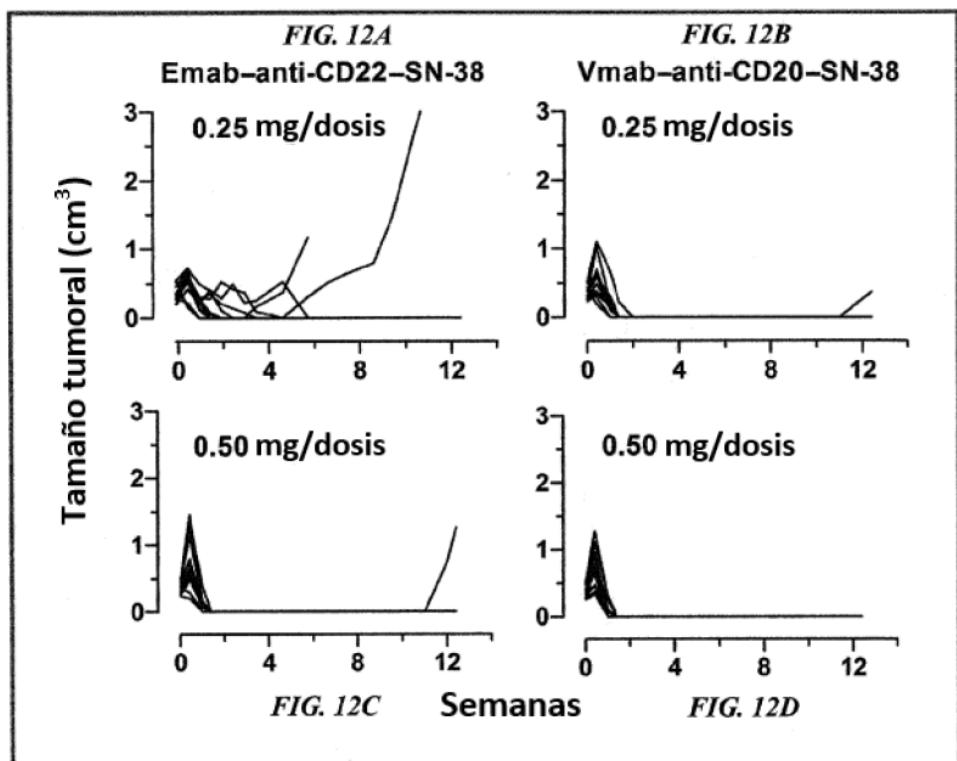


FIG. 13A

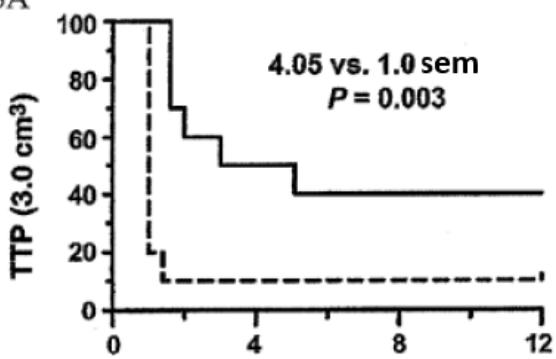


FIG. 13B

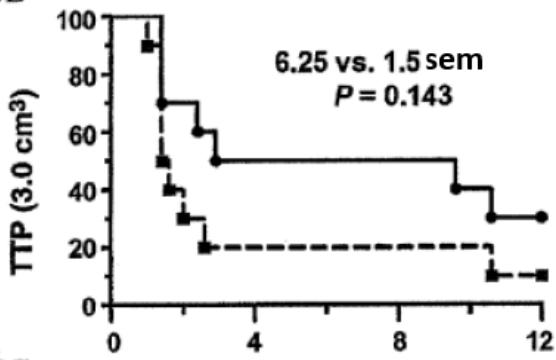


FIG. 13C

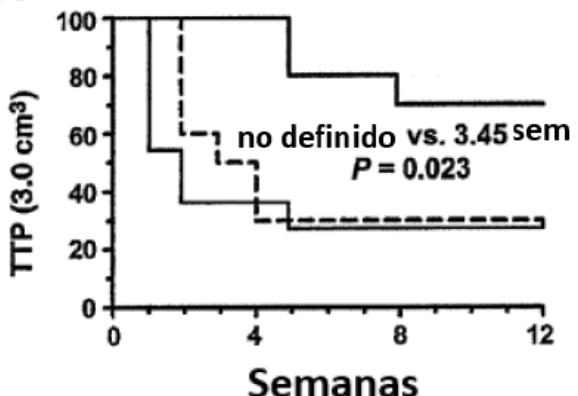


FIG. 14

Labetuzumab-SN-38: Paciente 009**Antecedentes quirúrgicos, de terapia quimio/MAb**